

Untersuchungen zur Analytik
und über das Vorkommen
von Hydroxyfettsäuren im Pflanzenreich

KLAUS REHM

April 1967

Untersuchungen zur Analytik und über das Vorkommen von

Hydroxyfettsäuren im Pflanzenreich

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Klaus Rehm

aus

München

April 1967



Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r
Tag der mündlichen Prüfung: 31.5.1967

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
I. Einteilung und Vorkommen von Hydroxyfettsäuren .	2
II. Über die in vivo und in vitro Bildung von Hydroxy- fettsäuren	4
III. Bisherige Verfahren zur Isolierung und Bestimmung von Hydroxysäuren bzw. ihren Estern	6
1. Gegenstromverteilung	6
2. Bildung unlöslicher Chelate	6
3. Säulenchromatographie	7
4. Papierchromatographie	8
5. Dünnschichtchromatographie	8
6. Gaschromatographie	9
IV. Entwicklung geeigneter Analysenmethoden	11
A. Isolierung	11
1. Übertragung und Modifizierung von Mikro- methoden der n-Fettsäuren auf Hydroxy- Fettsäuren	11
2. Extraktion der einzelnen Hydroxysäurekom- plexe und deren Trennungsgang	15
3. Dünnschichtchromatographie der freien Ge- samtfettsäuren	17
4. Überprüfung der Methylierung	23
5. Dünnschichtchromatographie der Fettsäure- methylester	26
6. Fraktionierung nach Stoffgruppen	29
7. Fraktionierung nach der Kettenlänge	31
a) Präparative Gaschromatographie	31
b) Präparative Verteilungschromatographie	32
B. Identifizierung	35
1. Übertragung und Modifizierung von Identifi- zierungs-Methoden für Normalfettsäuren auf Hydroxysäuren	35
2. Chromsäure-Abbau	36
3. Wolff-Kishner-Reduktion	39

4. Reaktionen der funktionellen Gruppen	41
a) Chromsäureoxydation zu Ketonen	41
b) Trimethylsilylierung	41
c) Acetylierung	42
d) Methylierung	43
5. Gaschromatographie	44
a) Entwicklung geeigneter Trennbedingungen	44
b) Gaschromatographie der Derivate ,	47
α. Hydrierte Säuren	47
β. Acetate und Methyläther	49
γ. Trimethylsilyläther	49
6. IR-Spektroskopie	55
7. Kernresonanz-Spektroskopie	58
V. Isolierungs- und Identifizierungsgang	64
VI. Untersuchung von 40 Drogen und Pflanzenextrakten auf das Vorkommen von Hydroxyfettsäuren	69
1. Algenextrakte	69
2. Harzführende Drogen	72
Citrullus colocynthis (L.) Schrad.	72
3. Pinus spec. (Coniferae)	82
4. Samenöle	84
EXPERIMENTELLER TEIL	85
I. Isolierung	85
1. Darstellung der Rohextrakte	85
2. Hydrolyse	86
3. Darstellung der Methylester	87
II. Chromatographische Untersuchungen	88
1. Dünnschichtchromatographie der Gesamtsäuren	88
2. Dünnschichtchromatographie der Quecksilber-II- acetat-Addukte	90
3. Dünnschichtchromatographie der Homologen	91
4. Präparative Dickschichtchromatographie	91
5. Säulenchromatographie	92
6. Gaschromatographie	92

III. Physikalische Untersuchungen	96
1. IR-Spektren	96
2. UV-Spektren	96
3. NMR-Spektren	96
IV. Darstellung der Derivate	97
1. Hydrierung	97
2. Quecksilber-II-acetat-Addukte	97
3. Silylierung	98
4. Acetylierung	98
5. Methylierung	99
6. Ketonoxydation	99
V. Abbau-Reaktionen	100
1. Permanganat-Perjodat-Abbau	100
2. Chromsäure-Abbau	100
3. Wolff-Kishner-Reduktion	101
VI. Reinigung und Absolutierung der Lösungsmittel	103
VII. Herkunft und Isolierung der Testsubstanzen	104
VIII. Untersuchung der Drogen	105
1. Dictiopteris polypodioides	105
2. Citrullus colocynthis	106
3. Pinus species	109
A N H A N G	110
Tabelle 1: Vorkommen von Hydroxysäuren im Pflanzen- und Tierreich (geordnet nach Familien)	110
Tabelle 2: Vorkommen von Hydroxysäuren (geordnet nach der Kettenlänge)	115
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	123



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554020_0065

E I N L E I T U N G

Hydroxyfettsäuren sind in den letzten Jahren in zahlreichen Varianten im Pflanzen- und Tierreich aufgefunden worden. Im Tierreich sind sie wichtiger Bestandteil der verschiedenen Sphingolipide des Gehirns, während sie im Pflanzenreich in erheblicher Konzentration bisher nur in den Triglyceriden einiger Samenöle, in Convolvulaceenharzen und in den Phytoglykolipiden Stärke- und Ölreicher Früchte entdeckt wurden. Als Intermediärprodukte spielen sie bei der Biosynthese von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren eine wichtige Rolle.

Ihr Nachweis und ihre Strukturaufklärung ist dadurch besonders erschwert, daß die meisten Hydroxyfettsäuren in der Pflanze nur in geringer Konzentration und begleitet von Epoxysäuren sowie vielen anderen Fettsäuretypen vorkommen.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, für die Gruppe der Hydroxyfettsäuren universell anwendbare Nachweisverfahren und Identifizierungsgänge auszuarbeiten, die für den Mikromaßstab noch gut geeignet sind. Die Methode sollte außerdem dazu dienen, neue Vorkommen von Hydroxyfettsäuren in niederen und höheren Pflanzen aufzufindig zu machen.

ALLGEMEINER TEIL

I. Einteilung und Vorkommen von Hydroxyfettsäuren (siehe Aufstellung Anhang S. 110)

Soweit die bis heute durchgeführten systematischen Untersuchungen bereits eine Aussage gestatten, gehören die Hydroxyfettsäuren zu den Pflanzenstoffen, die im Pflanzenreich nur sporadisch auftreten. Zwar kann von einer Art-spezifität, wie bei den Pflanzenarten *Strophanthus*, *Ricinus* und *Dimorphotheca*, gesprochen werden, aber mit Sicherheit ist ihr Vorkommen nicht familienspezifisch. Zum Beispiel enthalten von 100 untersuchten Euphorbiaceen-Ölen nur die von *Ricinus communis* und *Mallotus philippinensis* Hydroxyfettsäuren.

Hydroxyfettsäuren sind entweder über ihre Carboxyl-Gruppe mit Alkoholen verestert, mit Aminoalkoholen säureamidartig verknüpft oder über ihre Hydroxy-Gruppe mit Zuckern veräthert. Sie können auch untereinander zu langen Ketten polymerisieren, wobei ω -Hydroxyfettsäuren bevorzugt werden.

Trifft man eine Einteilung nach ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Stoffgruppen, so können fünf Hauptgruppen unterschieden werden:

1. G l y c e r i d e

Sie bilden die Samenfett in Pflanzen. In ihnen überwiegen Mono-Hydroxyfettsäuren mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von C_{18} und ungesättigtem Charakter. Seltener findet man Di-Hydroxyfettsäuren, wie sie z.B. in der Crucifere *Cardamine impatiens*, ferner in *Ricinus*-Öl und im Sporenöl von Brandpilzen nachgewiesen wurden.

2. W a c h s e

Verzweigtkettige Hydroxyfettsäuren sind nur in Bakterienwachsen enthalten, während β -Hydroxyfettsäuren in Bakterien und Hefen vorkommen. Am Aufbau der Cuticula von

Apfel, Agave, Liguster und Ölbaum, des Korkes von *Quercus suber* und des Carnaubawachses sind Mono-, Di- und Tri-Hydroxyfettsäuren beteiligt.

3. H a r z e

Wie bei den Wachsen sind auch bei den Harzen ω -Hydroxyfettsäuren zu finden, z.B. in Coniferen und Cupressaceen. Hydroxy-Glykosidsäuren ($C_{10} - C_{16}$) bilden einen wichtigen Baustein der Convolvulaceenharze.

4. P h y t o g l y k o l i p i d e u n d S p h i n g o - l i p i d e

Bei den Hydroxyfettsäuren dieser Stoffgruppen handelt es sich ausschließlich um α -Hydroxysäuren mit Kettenlängen von C_{14} bis C_{26} , die säureamidartig mit Aminoalkoholen verknüpft sind. Nachgewiesen wurden die Phytoglykolipide in Mais, Soja, Erdnuß, die Sphingolipide in Pilzen und im Gehirn von Säugetieren.

II. Über die in vivo und in vitro Bildung von Hydroxyfettsäuren

Unsere Kenntnisse über die Bildung von Hydroxyfettsäuren und ihre mögliche Rolle im Fettstoffwechsel sind noch lückenhaft.

LYNEN¹⁾ zeigte in seinen grundlegenden Untersuchungen über die Biosynthese der Fettsäuren, daß β -Hydroxyfettsäuren als Zwischenstufen der Biosynthese auftreten. Wie an einem Enzymsystem der Hefe nachgewiesen werden konnte, entstehen diese β -Hydroxyfettsäuren durch Reduktion aus β -Ketosäuren, um dann anschließend durch Dehydratisierung sofort weiter in die entsprechenden ungesättigten Fettsäuren umgewandelt zu werden. SCHEUERBRANDT und Mitarb.²⁾ bestätigten diese Ergebnisse bei den anaeroben Bakterien *Clostridium butyricum* und *Lactobacillus plantarum*. Auch in *Serratia marcescens* konnten BISHOP und STILL³⁾ β -Hydroxyfettsäuren nachweisen. Sie beobachteten, daß bei höherer Temperatur (37°) keine Hydroxyfettsäuren mehr zu finden waren. Auch PUGH und Mitarb.⁴⁾ gelang es bei *Escherichia coli* nachzuweisen, daß β -Hydroxysäure-CoA-Verbindungen als Zwischenstufen beim Aufbau gesättigter und ungesättigter n-Fettsäuren fungieren. Aerobier benötigen dazu Sauerstoff, während Anaerobier eine de-novo-Synthese durchzuführen im Stande sind. Je nach Zugabe einer bestimmten Enzym-Protein-Fraktion zu β -Hydroxy-Decan-ACP bzw. -Lauryl-ACP bzw. -Myristyl-ACP und TPNH (=NADP) entstehen gesättigte oder ungesättigte n-Fettsäuren. Da nach den bisherigen Arbeiten unter Mitwirkung des Multienzymkomplexes¹⁾ immer nur β -Hydroxyfettsäuren als Zwischenprodukte entstehen, muß das Auftreten von α -Hydroxyfettsäuren und der Fettsäuren mit Hydroxygruppen in anderen Positionen der Kette auf einen davon abweichenden, etwa im Sinne eines von MASON⁵⁾ als "mixed function oxidases" Systems bezeichneten Bildungsmechanismus zurückzuführen sein.

Bemerkenswerterweise konnten STOFFEL und SCHIEFER⁶⁾ bei ihren Arbeiten über den Stoffwechsel der Polyenfettsäuren zeigen, daß bei Olefinisierungsreaktionen keine Hydroxyfettsäuren als Intermediärprodukte auftreten.

Um einen Sonderfall dürfte es sich bei der Biosynthese der Ricinolsäure handeln. JAMES und Mitarb.⁷⁾ zeigten, daß die Ricinolsäure aus Ölsäure ohne molekularen Sauerstoff, und zwar erst nach drei bis vier Wochen nach Vorliegen des n-Fettsäure-Gemisches im Embryo und im Endosperm synthetisiert wird. Hier handelt es sich eindeutig um ein E n d p r o - d u k t der Biosynthese. Hierfür spricht auch der hohe Prozentgehalt an Ricinolsäure im Fettsäuregemisch des reifen Samens.

Andererseits lassen sich nach Lagerung von Linol- und Linsäure Hydroxyfettsäuren nachweisen. Hierbei handelt es sich eindeutig um eine durch Luftsauerstoff ausgelöste A b b a u r e a k t i o n , die nach JAMES und Mitarb.⁸⁾ zunächst über eine α -Hydroxyfettsäure verläuft. Durch Decarboxylierung entsteht dann ein primärer Alkohol, dessen alkoholische Gruppe über eine aldehydische Gruppe zu Carboxyl weiteroxydiert wird, so daß eine um eine Kohlenstoffeinheit kürzere ungesättigte Fettsäure entsteht.

III. Bisherige Verfahren zur Isolierung und Bestimmung von Hydroxysäuren bzw. ihren Estern

1. Gegenstromverteilung

Sie wurde angewendet bei der Untersuchung von Wollwachs⁹⁾¹⁰⁾, Pilzen¹¹⁾ und Cuticula¹²⁾. DIAMOND und Mitarb.¹³⁾ reinigten mit diesem Verfahren Dimorphocolsäuremethylester. Als Trennsysteme kamen Benzinfraktionen mit Acetonitril bzw. wässrigen Alkoholen zur Anwendung. Dabei waren durchschnittlich 400 Verteilungsschritte notwendig.

Der Nachteil der Gegenstromverteilung liegt darin, daß man relativ geringe Mengen an reiner Substanz erhält. Es tritt nämlich eine Auftrennung sowohl nach der Kettenlänge, als auch nach Anzahl und Stellung der Hydroxy-Gruppen in der Fettsäurekette auf und somit findet eine Überlappung von kurz-kettigen Monocarbonsäuren mit langkettigen Hydroxy-Fettsäuren statt. Abgesehen vom zeitlichen Aufwand werden große Lösungsmittel benötigt. Außerdem muß eine Vorfraktionierung durchgeführt werden. Da verhältnismäßig viel Substanz eingesetzt werden muß, ist sie als Mikromethode nicht verwendbar. Aus diesen Gründen konnte sich diese Methode bisher nur sehr wenig durchsetzen.

2. Bildung unlöslicher Chelate

Speziell bei den α -Hydroxysäuren können Metallchelate gebildet werden, die wesentlich schwerer löslich sind als die Salze der n-Fettsäuren. Nur die freien Säuren eignen sich für diese Trennung, da Ester keine Chelate bilden. MILBURN und TRUTER¹⁴⁾ fanden dabei heraus, daß Kupferchelate, aus äthanolischer Kupfernitratlösung gebildet, am besten geeignet sind. KISHIMOTO und RADIN¹⁵⁾ verbesserten diese Methode, indem sie Kupferoleatlösung verwendeten.

Nachteilig ist, daß bei Anwesenheit größerer n-Fettsäuremengen, diese teilweise mitausgefällt werden. Daher ist eine Vorfraktionierung meistens nicht zu umgehen.

Säulenchromatographie

FRANKEL und Mitarb.¹⁶⁾ trennten v e r t e i l u n g s - c h r o m a t o g r a p h i s c h Ricinus-, Strophanthus- und Dimorphotheca-Methylester mit Methanol-Benzin (20:80) als stationäre Phase auf Kieselgel und Methanol-Benzin (2:98) als Elutionsmittel. Sie erhielten damit eine Auftrennung in n-, Mono-Hydroxy- und Di-Hydroxyfettsäuren.

Eine Phasenumkehrverteilung gelang mit Isooctan auf silikonisiertem Celite und Acetonitril als Oberphase¹⁷⁾. FULCO und MEAD¹⁸⁾ trennten acetylierte Hydroxysäuremethylester mit Mineralöl auf silikonisiertem Celite als immobile, und Wasser-Aceton als mobile Phase. GUNSTONE¹⁹⁾ berichtet von einer Auftrennung der Ricinus-Fettsäuren auf paraffiniertem Celite mit wässriger Acetonlösung.

Ein großer Nachteil der Verteilungschromatographie ist ihre Temperaturabhängigkeit, wodurch starke Phasenverschiebungen eintreten können. Auch lassen sich verschiedene Lösungsmittel nicht genügend am Trägermaterial adsorbieren, was rasches Nachlassen des Trennvermögens zur Folge hat.

Mit der A d s o r p t i o n s - S ä u l e n c h r o m a t o - g r a p h i e können nur Gruppentrennungen durchgeführt werden. Freie Säuren werden auf Kieselgel bzw. Kieselsäure mit Benzin und Benzin-Äther-Gemischen¹⁵⁾²⁰⁾ bzw. Benzin-Methanol²¹⁾ getrennt. Jedoch ist ein großer apparativer Aufwand erforderlich, da bei der Eluierung mit Vakuum oder Überdruck gearbeitet werden muß.

Methylester wurden mit Hexan-Äther-Gemischen über Florisilsäulen²²⁾ und über Aluminiumalaun²³⁾²⁴⁾²⁵⁾ getrennt. MAZLIAK empfiehlt Magnesiumsilikat²⁶⁾ als Adsorbens. Über Kieselgelsäulen wurde mit Hexan-Äther Trennungen durchgeführt²⁷⁾.

DE VRIES²⁸⁾ trennte mittels Silbernitratimprägnierung cis-trans-Isomere und gesättigte Fettsäuren von ungesättigten. Jedoch treten dabei Überlappungen auf, da, ähnlich wie bei der Gaschromatographie, Trennungen auch nach der Kettenlänge stattfinden, so daß sich z.B. eine C₂₄-Hydroxyfettsäure und Ölsäure nicht trennen lassen.

Ionen austauschharze als Hilfsmittel bei der Silbernitratimprägnierung werden von zwei Forschergruppen beschrieben²⁹⁾³⁰⁾.

Obwohl mittels Säulenchromatographie große Substanzmengen aufgetrennt werden können, hat sie eine Reihe von Nachteilen:

Zunächst ist ein hoher Zeitaufwand erforderlich, da die Substanzen langsam in der Säule wandern und die einzelnen Fraktionen dünnenschichtchromatographisch überprüft werden müssen. Außerdem ist mit hohen Substanzverlusten zu rechnen. Ferner müssen mögliche Veränderungen der Substanz durch eine katalytische Wirkung des Adsorbens in Betracht gezogen werden.

4. Papierchromatographie

Hier kann nur nach dem Prinzip der Umkehrphasen-Chromatographie gearbeitet werden, wobei das Papier mit Paraffin- oder Silikonöl imprägniert wird und als Laufmittel eine Säure dient. Eine Methode mit nicht imprägniertem Papier ist bisher noch nicht beschrieben worden. An dieser Stelle sind die Arbeiten von ROUSER³¹⁾, KAUFMANN³²⁾ und SKIPSKI³³⁾ zu nennen.

Wegen den langen Laufzeiten (etwa 16 Stdn.) und der geringen Empfindlichkeit scheidet die Papierchromatographie heute praktisch aus.

5. Dünnschichtchromatographie

Sie ist wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und ihrer Schnelligkeit der Papierchromatographie weit überlegen. Auch können aggressive Sprühreagenzien angewandt werden.

SUBAO und ACHAYA³⁴⁾ benützten zur Trennung der freien Säuren eine Äther-Leichtpetroleum-Säure-Mischung, während das von BRIESKORN³⁵⁾ angegebene Trennsystem für Hydroxyfettsäuren nicht geeignet ist. KLENK³⁶⁾ verwendete 1,2-Dichloräthan.

Bei der Chromatographie der Methylester tritt eine Auftrennung in n- und Hydroxyfettsäuren ein. Im Gegensatz zu den freien Säuren, werden die Methylester nicht nach der Stellung der Hydroxy-Gruppe im Fettsäuremolekül getrennt. An erster Stelle ist die Arbeit von VIOQUE und HOLMAN³⁷⁾ zu nennen, die bezüglich der Gruppentrennung sehr gute Ergebnisse mit Hexan-Äther-Gemischen erzielten. In Anlehnung an diese Arbeit sind eine Reihe von Veröffentlichungen erschienen²¹⁾ 34)38). Nach unseren Erfahrungen ergibt das von SGOUTAS angegebene Chloroform-Methanol-Essigsäure-Gemisch³⁹⁾ keine Trennung. Auch die von LEGLER⁴⁰⁾ verwendeten Laufmittel sind für Gruppentrennungen nicht geeignet.

Als Sprühreagenzien werden Kaliumchromat-Schwefelsäure, Phosphormolybdänsäure, Rhodamin B, Bromthymolblau, 2',7'-Dichlorfluoreszein, Joddampf, Ammoniummetavanadat⁴¹⁾, Bromthymolblau-Natronlauge⁴²⁾, Chlorsulfonsäure in Eisessig⁴⁰⁾ angegeben. Ein spezifisches Nachweisreagenz für Hydroxysäuren wurde allerdings bis jetzt noch nicht beschrieben.

Schließlich sind noch die komplex bildenden Agentien, wie Silbernitrat⁴³⁾⁴⁴⁾ und Borsäure⁴⁵⁾⁴⁶⁾ zu erwähnen, die mit dem Adsorbens gemischt teilweise recht brauchbare Trennungen für cis-trans-Isomere ergeben.

Gaschromatographie

Um homologe n-Fettsäuren trennen zu können, ist die 1950 eingeführte Gaschromatographie die Trennmethode der Wahl. Bei Hydroxyfettsäuren ergeben sich aber durch die Hydroxy-Gruppe sehr lange Retentionszeiten. Die meisten Autoren arbeiten deshalb mit Säulentemperaturen von 200 bis 350°. Dabei werden

aber nur teilweise befriedigende Ergebnisse erreicht, da die Methode nur für spezielle Probleme anwendbar und für eine Gesamtanalyse, die auch sehr langkettige Säuren einschließt, nicht brauchbar ist.

Die Arbeiten von MIWA und Mitarb.⁴⁷⁾⁴⁸⁾, LITCHFIELD und Mitarb.⁴⁹⁾ und KAUFMANN und Mitarb.⁵⁰⁾ verweisen auf Hydroxyfettsäure-Trennungen. Eine Studie über Hydroxyfettsäuren veröffentlichte O'BRIEN und ROUSER⁵¹⁾, während MORRIS und Mitarb.⁵²⁾ die Veränderung von vicinal-ungesättigten Hydroxyfettsäuren in Abhängigkeit von der Einspritztemperatur studierten.

Weiterhin wurden gaschromatographische Analysen auf polaren Polyester- und apolaren Apiezon-Säulen mit folgenden Hydroxyfettsäuremethylestern durchgeführt: α -Hydroxyfettsäuren¹⁵⁾²²⁾⁵³⁾, Ricinol-²¹⁾³⁷⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾, Dimorphecol-³⁸⁾⁵⁶⁾, Lesquerol-⁵⁷⁾, Tragopogon-⁵⁸⁾, Kork-⁵⁹⁾, Isano-⁶⁰⁾⁶¹⁾, Äpfel- und Carnaubawachse-Säuren²⁶⁾ und Hydroxyfettsäuren aus *Serratia marcescens* 3).

Verkürzungen der Retentionszeiten wurden durch chemische Umsetzung der Hydroxy-Gruppe erzielt. KISHIMOTO und RADIN²²⁾ führten eine Verätherung mit Methanol durch und konnten damit langkettige α -Hydroxyfettsäuren trennen. WOOD und Mitarb.⁶²⁾ verätherten mit Trimethylsilan, wobei die Retentionszeiten noch stärker reduziert wurden. Acetoxfettsäuren¹⁵⁾²⁶⁾⁵¹⁾⁵⁹⁾ ergaben in der Regel noch längere Retentionszeiten als Hydroxyfettsäuren.

Entwicklung geeigneter Analysenmethoden^{*)}

Da es sich bei den unter III. angeführten Arbeiten um Einzeluntersuchungen handelt und ein allgemein anwendbares Verfahren fehlt, das nicht nur die Hydroxyfettsäuren der Glyceride, sondern auch der Harze, einfache Sphingolipide und Phytoglykolipide erfaßt, versuchten wir einen Analysen- und Trennungsgang zu entwickeln. Da bei den meisten Untersuchungen mit großen Substanzmengen gearbeitet wird, die bei biochemischen Untersuchungen und Spurenanalysen nicht zugänglich sind, war eine Mikromethode wünschenswert.

Da Testsubstanzen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, im Handel nicht erhältlich waren, isolierten wir sie aus pflanzlichen und tierischen Material.

A. Isolierung

1. Übertragung und Modifizierung von Mikromethoden der n-Fettsäuren auf Hydroxy-Fettsäuren

Prinzipiell können Hydroxyfettsäuren nach den für normal Fettsäuren bekannten Methoden isoliert werden. Es ergeben sich allerdings eine Reihe zusätzlicher Arbeitsschritte, da Hydroxyfettsäuren mit n-Fettsäuren vergesellschaftet sind und von diesen abgetrennt werden müssen. Da eine Hydroxy-Gruppe die physikalisch-chemischen Eigenschaften einer FS außerdem deutlich verändert, mußten die bekannten Methoden im einzelnen auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden.

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit benutzt:

FS	= Fettsäuren
ME	= Methylester
TMS	= Trimethylsilyläther
DC	= Dünnschichtchromatographie
GC	= Gaschromatographie

H y d r o l y s e

Da bei der in der neueren Literatur beschriebenen Umesterung mit methanolischer Salzsäure keine quantitative Umsetzung erzielt wird und vor allem der unverseifbare Anteil schwer beseitigt werden kann, verwendeten wir die alkalische Verseifung. Esterbindungen, wie sie bei Fetten vorliegen, werden in der Hitze mit in Kalilauge in einer Stunde quantitativ gespalten. Phosphatide werden mit starker Lauge bei niederen Temperaturen verseift, während die Säureamidbindung der einfachen Spingolipide und Phytoglykolipide nur mit heißer Lauge und nach längerer Einwirkung gespalten werden. Der unverseifbare Anteil kann dabei leicht mit Petroläther ausgeschüttelt werden.

Da beim Ansäuern der Seifenlösung eine Erwärmung eintritt, die eine Reaktion zwischen der Carboxyl- und der Hydroxylgruppe unter Bildung von Lactiden und Lactonen begünstigt, muß der Arbeitsgang unter Kühlung ausgeführt werden. Außerdem empfiehlt es sich, das Extraktionsmittel vor Zugabe der Säure zuzusetzen.

Glykosidsäuren können allerdings nur mit Mineralsäuren gespalten werden, da die chemische Natur der Glykosidbindung einem Alkaliangriff auch unter extremen Bedingungen standhält. Nach Untersuchungen von AUTERHOFF und DEMLEITNER⁶⁴⁾ eignet sich eine Schwefelsäure-Äthanol-Mischung am besten. Bei Verwendung anderer Säuren und Mischungsverhältnisse muß mit einer wesentlichen Verlängerung der Reaktionszeit gerechnet werden.

Für die M e t h y l i e r u n g d e r f r e i e n
F e t t s ä u r e n in Mikromengen bis zu einem Gramm hat sich die vereinfachte Diazomethanmethode nach POHL⁶⁵⁾ am besten bewährt, da sie sehr schonend ist. Für den präparativen Maßstab verwendeten wir die wesentlich schnellere Borfluorid-Methanol-Methode nach MORRISON und SMITH⁶⁶⁾. Beide Verfahren überprüften wir mittels DC und GC daraufhin, ob auch die Hydroxy-Gruppe methyliert wird. Dies war

jedoch nicht der Fall. Bei Methode 2 entsteht durch Hydrolyse des Bortrifluorids neben Borsäure die sehr starke Tetrafluorborsäure. Diese zersetzt vicinal ungesättigte Hydroxy-FS, wie Dimorphecolsäure und bewirkt Ringöffnungen von Epoxysäuren zu Di-Hydroxy-FS.

Die Abtrennung der gesättigten von den ungesättigten FS mittels T i e f k ü h l k r i s t a l l i s a t i o n kann auch auf Hydroxy-FS übertragen werden. Eine quantitative Trennung ist jedoch nicht möglich, da zwar die Fraktion der gesättigten FS rein ist, aber die der ungesättigten FS, auch nach wiederholter Durchführung, noch Spuren von gesättigten FS enthält. Als gutes Anreicherungsverfahren ist diese Methode aber verwendbar.

Um auch die ungesättigte FS-Fraktion vollkommen rein zu erhalten, zogen wir die Darstellung und Auftrennung von Q u e c k s i l b e r - I I - a c e t a t - A d d u k t e n hinzu, die POHL⁶⁵⁾ zur Trennung von ungesättigten Algen-FS entwickelte. Dabei war zu überprüfen, ob auch die Hydroxy-Gruppe mit Quecksilbersalzen Komplexe bildet, ferner ob sie einer scharfen Abtrennung hinderlich ist. Beides ist nicht der Fall, so daß das Verfahren auf Hydroxy-FS übertragen werden konnte. Wie aus Abb. 1, S.14, ersichtlich ist, haben die Addukte aus Hydroxy-FS und n-FS mit gleicher Doppelbindungszahl ungefähr gleiche R_f -Werte. Der verbliebene Rest an gesättigten FS ergibt bei der chromatographischen Auftrennung den höchsten R_f -Wert und stört die Auftrennung nach Zahl der Doppelbindungen nicht.

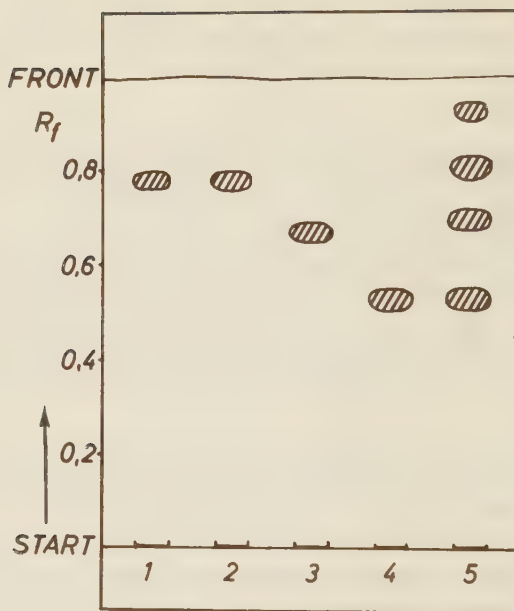


Abb. 1

Quecksilber-II-acetat-Adduktrennung

Adsorbens: Kieselgel G - Kieselgur G (3:7)

Laufmittel: Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100:0.5:15.7)

- 1 = $C_{18} = {}^1OH^{12}$ *)
 2 = $C_{18} = {}^1OH^9$
 3 = $C_{18} = {}^2OH^9$
 4 = $C_{18} = {}^3OH^{18}$
 5 = $C_{18} = 0$; $C_{18} = 2$; $C_{18} = 3$ (absteigender R_f)

*) Folgende Nomenklatur wurde in dieser Arbeit benützt:

Beispiel $18 = {}^1OH^9$

Große Zahl (18) = Anzahl der Kohlenstoffatome = Kettenlänge

Doppel oder Dreifachpunkt (=)(=) = Doppel- oder Dreifachbindung

Index unten (1) = Anzahl der Doppelbindungen

Index oben (9) = Stellung der OH-Gruppe in der Kette

Die Übertragung auf Säule ist möglich. Dabei müssen natürlich die einzelnen Fraktionen dünn-schichtchromatographisch überprüft werden.

2. Extraktion der einzelnen Hydroxysäurekomplexe und deren Trennungsgang

Bei Überprüfung der üblichen Extraktionsmethoden zur Gewinnung des Rohextraktes muß zwischen den einzelnen Hydroxysäurekomplexen unterschieden werden. Ein einziges Extraktionsmittel ist nicht ausreichend.

G l y c e r i d e werden schonend am besten im Soxhlet mit Petroläther oder mit kaltem Chloroform bzw. Methylenchlorid durch Verrühren gewonnen. Nach dreimaliger Behandlung ist das Drogenmaterial restlos entfettet.

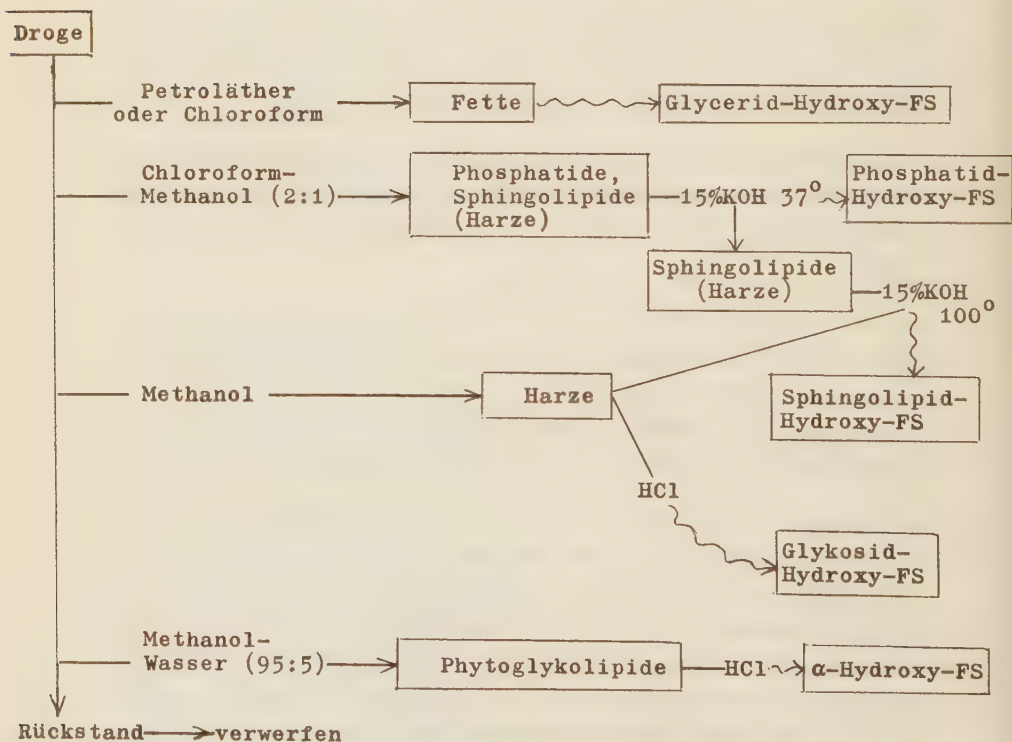
Für P h o s p h a t i d e ist obige Behandlung nicht ausreichend. Eine Extraktion mit Chloroform-Methanol-Mischungen unter Rückfluß oder besser im Autoklaven eignet sich am besten.

S p h i n g o l i p i d e werden wie Phosphatide behandelt, jedoch erhielten wir bei Extraktionsversuchen mit Aceton, Petroläther und Benzol die gleichen Ergebnisse. Petroläther und Benzol sind wegen ihres extrem apolaren Charakters sehr günstig bei farbstoffreichen Drogen.

P h y t o g l y k o l i p i d e bereiten wegen ihrer Symplexbildung mit Proteinen und damit äußerst schlechten Extrahierbarkeit die größten Schwierigkeiten. ZOFCSIK⁶³⁾ verwendete nacheinander Chloroform, Methanol, Wasser und deren Mischungen. Da diese Methode einen zu großen Zeitaufwand erfordert, vereinfachten wir die Extraktion dadurch, daß wir eine Methanol-Wasser-Mischung verwendeten. Durch mehrmalige Behandlung in der Hitze konnten wir Phytoglykolipide aus gemahlenden Soja-, Erdnuß- und Pinienkernen gut extrahieren.

Für Glykosidharze können wir die von LEGLER⁴⁰⁾ zur Aufarbeitung von Ipomea fistula Blättern verwendete Methode als bestes Verfahren ansprechen. Dabei wird nach vorheriger Entfettung mit Methanol heiß extrahiert und der Rohextrakt über eine Kohle-Celite-Säule gereinigt.

Treten mehrere Stoffgruppen zusammen in einer Droge auf, so ist es besonders wichtig, die Hydroxysäurezusammensetzung der einzelnen Komplexe zu ermitteln. Dies ist aber nur über einen speziellen Trennungsgang möglich, den wir für diese Zwecke ausgearbeitet haben (Schema 1).



Schema 1
Trennungsgang

Zuerst werden die Glyceride mit Petroläther oder Chloroform entfernt und getrennt weiterverarbeitet. Die Wahl des nachfolgenden Extraktionsmittels hängt davon ab, ob Chlorophyll vorhanden ist, da dieses mit Chloroform mitextrahiert wird.

Der Drogenrückstand wird dann mit einem Gemisch von Chloroform-Methanol (2:1) behandelt, wobei die Phosphatide und Sphingolipide und teilweise auch Harze herausgelöst werden. Durch Verseifung mit 15% Kalilauge bei 37° 63) werden die Esterphosphatide gespalten, während die Sphingolipide und Harze intakt bleiben. Eine Trennung in diesen beiden Verbindungsklassen gelingt durch Behandlung mit heißer 15%iger Kalilauge. Die Säureamidbindung der Sphingolipide wird gespalten, die glykosidische Bindung der Harzsäuren nicht. Erneute Extraktion des Drogenrückstandes mit heißem Methanol ergibt die Hauptmenge an Glykosidharz, während bei der letzten Drogenextraktion mit wässrigem Methanol die Phytoglykolipide gewonnen werden.

Dünnschichtchromatographie der freien Gesamtfettsäuren

Die DC der freien FS dient zunächst zur ersten orientierenden Überprüfung. Wir entwickelten hierzu das Laufmittel Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2) für nicht imprägniertes Kieselgel.

Dabei stellten wir fest, daß neben der guten Gruppentrennung in n-FS, Epoxy-, Mono-Hydroxy- und Di-Hydroxy-FS (Abb. 2, S. 18), bei den Hydroxy-FS eine Trennung nach der relativen Stellung der Hydroxy-Gruppe zur Carboxyl-Gruppe stattfindet. Je weiter die Hydroxy-Gruppe von der Carboxyl-Gruppe entfernt ist, einen umso höheren R_f -Wert hat die FS. Nur ω -Hydroxy-FS besitzen einen tieferen R_f -Wert als α -Hydroxy-FS, da hier anstelle einer sekundären alkoholischen Gruppe eine primäre vorhanden ist. Auf diese Weise gelang uns z.B. die Trennung von C_{18} -FS mit einer Hydroxy-Gruppe in Position 2, 9, 12 und 18 (Abb. 3, S. 19 und Abb. 5, S. 21).

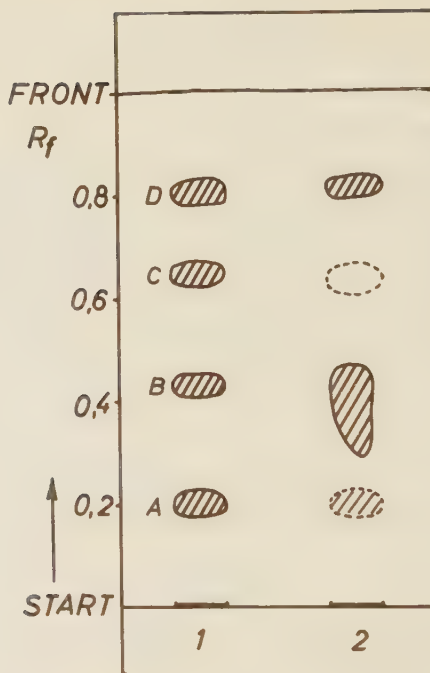


Abb. 2

DC Trennung der Stoffgruppen

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2)

1 = A = 3,11-Dihydroxytetradecansäure ($14=_{\text{O}}\text{OH}^{3,11}$)

B = Ricinolsäure ($18=_{\text{O}}\text{OH}^{12}$)

C = Vernolsäure ($18=_{\text{O}}\text{OH}^{12-13}$)

D = Stearinsäure ($18=_{\text{O}}$)

2 = Ricinusgesamt-FS

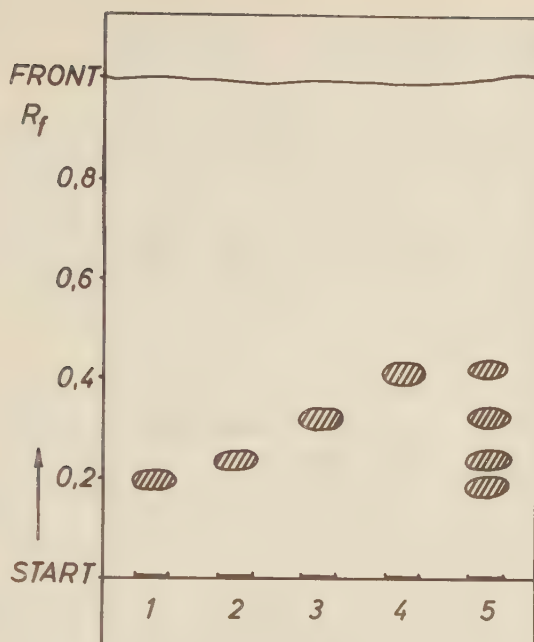
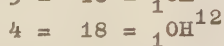
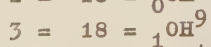
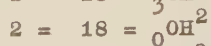
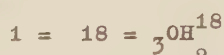


Abb. 3

DC Trennung der Stellungsisomeren

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2)



5 = Gemisch der FS 1 - 4

Dabei hat aber der Sättigungsgrad der FS keinen Einfluß auf die Laufhöhe, wie wir bei einem Vergleich der C₁₈-FS mit 0, 1 und 2 Doppelbindungen feststellen konnten (Abb. 4).

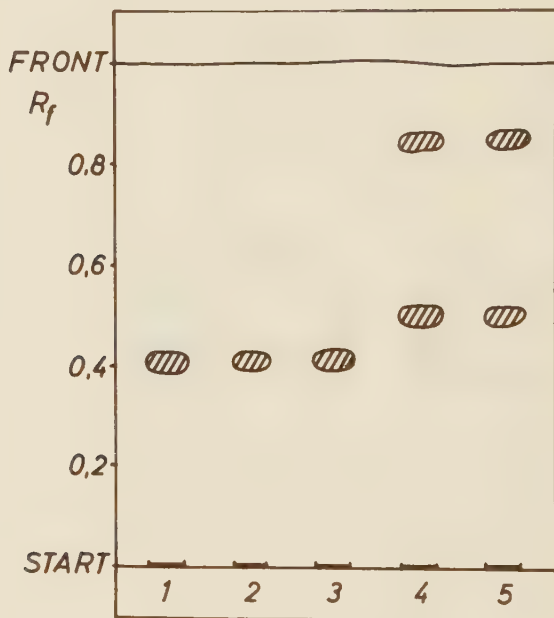
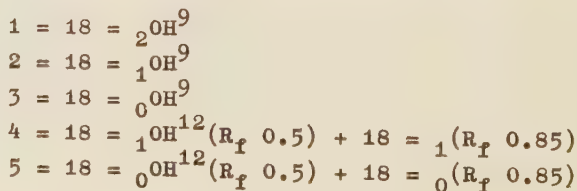


Abb. 4

DC der freien FS

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2)



Abgesehen davon kann man durch DC der freien FS Hinweise auf die Struktur der Hydroxy-FS erhalten. Da mit den Gesamt-FS oft Farbstoffe mitisoliert werden, die den Nachweis auf der Platte stören, empfiehlt sich in solchen Fällen eine Methylierung und präparative Abtrennung der ME, wobei die Farbstoffe in den meisten Fällen am Startpunkt zurückbleiben (Abb.38). Die auf diese Weise isolierten Hydroxy-FS-ME werden erneut verseift und DC untersucht. Besonders bewährt hat sich dieses Verfahren bei der Aufklärung der α -Hydroxy-FS in *Citrullus colocynthis* (siehe S. 72).

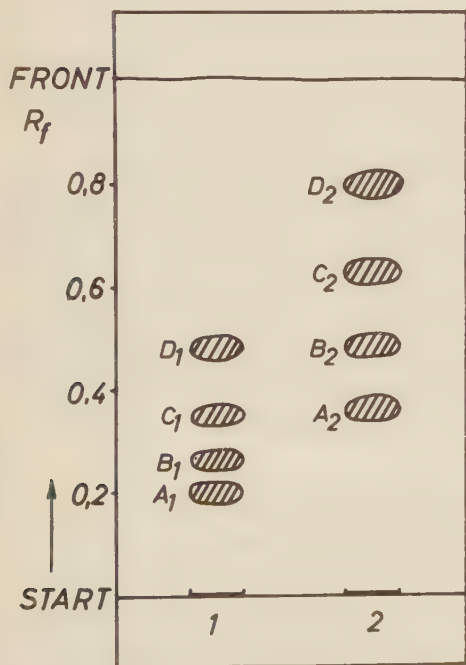
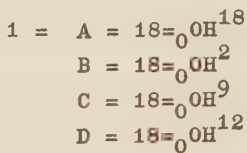


Abb. 5

DC der freien Hydroxy-FS
und deren Acetate

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform-
Äthylacetat-
Ameisensäure
(90:10:2)



2 = Acetate von 1

Zum Nachweis der FS auf der DC-Platte muß auf allgemeine Fettreagenzien zurückgegriffen werden. Zunächst verwendeten wir den Fluoreszenzindikator 2',7'-Dichlorfluorescein, der im kurzwelligen UV gelbfluoreszierende Flecke zeigt. Da dieser Indikator jedoch säureempfindlich ist (Säure im Laufmittel), befriedigt dieser Nachweis nicht restlos. Jod lagert sich nicht nur an ungesättigte, sondern auch an gesättigte FS, so daß durch Einstellen in eine Jodkammer alle FS nachgewiesen werden können. Wir versuchten eine Reihe von Farb-reagenzien, wie Vanillin-Schwefelsäure, Echtblausalz B in Natronlauge, Bromthymolblau in Natronlauge, Anilin-Diphenylaminphosphat u.a.m., ohne eine Verbesserung zu erreichen. Mit dem Fluoreszenzindikator P_1 (siehe unter präp.Dickschichtchrom.) fanden wir eine bequeme Nachweismethode für alle FS. Damit fluorescieren FS unter dem UV-Licht mit einer bläulichen Farbe auf grüngelbem Untergrund. Der große Vorteil ist, daß anschließend Sprühreagenzien verwendet werden können.

Schließlich gelang es uns auch für α -Hydroxy-FS ein spezielles Nachweisreagenz zu finden. Bei Oxydationsversuchen von ungesättigten FS durch Luftsauerstoff entdeckten wir in dem von VOGEL⁶⁶⁾ angegebenen Reagenz auf Peroxyde ein spezifisches Reagenz auf α -Hydroxy-FS. Das aus Eisen(II)sulfat und Ammonrhodanid bestehende Reagenz färbt Peroxyde rot an, während α -Hydroxy-FS unter Bildung eines Eisenkomplexes eine zitronen- bis grünlichgelbe Farbe annehmen. Die restlichen FS bleiben dabei unsichtbar.

Wir schlagen daher folgende Nachweismethode vor:

Zunächst wird nach dem Trocknen die P_1 -Fluoreszenzplatte unter dem UV-Licht betrachtet, die sichtbaren Flecke mit einer Nadel umrandet und bei Verdacht auf α -Hydroxy-FS mit oben genanntem Reagenz besprüht. Sind keine α -Hydroxy-FS vorhanden, wird die Fluoreszenzplatte in eine Osmiumtetroxyd-Atmosphäre gebracht, wodurch ungesättigte FS schwarz angefärbt werden⁶⁵⁾. An dieser Stelle kann auch auf Begleitstoffe geprüft werden (siehe unter ME). Eine Bestätigung für das Vorhandensein von Hydroxy-FS kann durch Acetylierung und an-

schließende DC erhalten werden, weil durch die Veresterung eine R_F -Wert-Erhöhung um ca. 0.3 eintritt (Abb. 5, S. 21).

4. Überprüfung der Methylierung

Die DC Überprüfung, ob eine Methylierung der freien FS zu Estern quantitativ erfolgt ist, ist besonders bei gefärbten Lösungen wichtig. Bei der Diazomethan-Methode kann nur bei farblosen Lösungen die Beendigung der Methylierung durch das Auftreten des überschüssigen gelben Diazomethans festgestellt werden. Da bei gefärbten Lösungen das Ende der Umsetzung nicht mehr visuell beobachtet werden kann, ist eine DC Überprüfung nötig.

Das von uns verwendete Laufmittel für Gesamt-FS-ME ist nur zur Überprüfung der quantitativen Umsetzung zu ME der n-FS geeignet, da hier freie Hydroxy-FS und deren ME den gleichen R_F -Wert besitzen, während die freien n-FS und n-FS-ME einen R_F -Unterschied von ca. 0.8 haben (Abb. 6, S. 24). Für die Hydroxy-FS fanden wir schließlich das von uns für die DC der freien Gesamt-FS entwickelte Laufmittel geeignet. Nicht methylierte Hydroxy-FS besitzen einen R_F -Wert um 0.45, methylierte Hydroxy-FS um 0.8 (Abb. 7, S. 25). Somit kann die Methylierung sowohl der freien n-FS als auch der freien Hydroxy-FS zu Estern leicht überprüft werden.

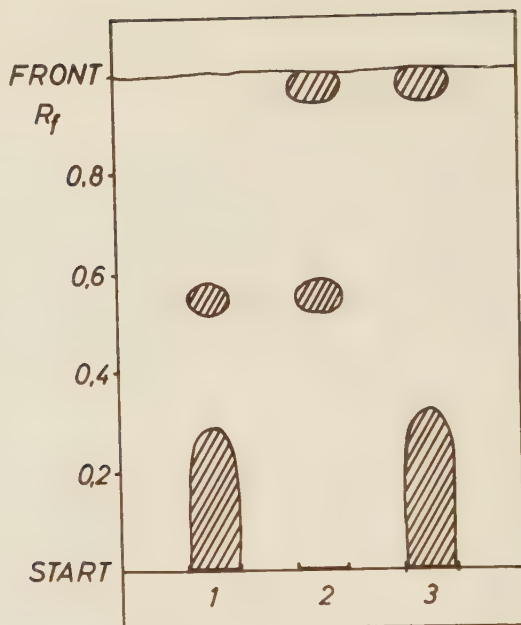


Abb. 6

Überprüfung der Methylierung der n-FS

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Benzin-Äther (1:1)

- 1 = 18 = 0 und 16 = OH^2 frei
 2 = 18 = 0 und 16 = OH^2 ME
 3 = 18 = 0 unvollständig methyliert

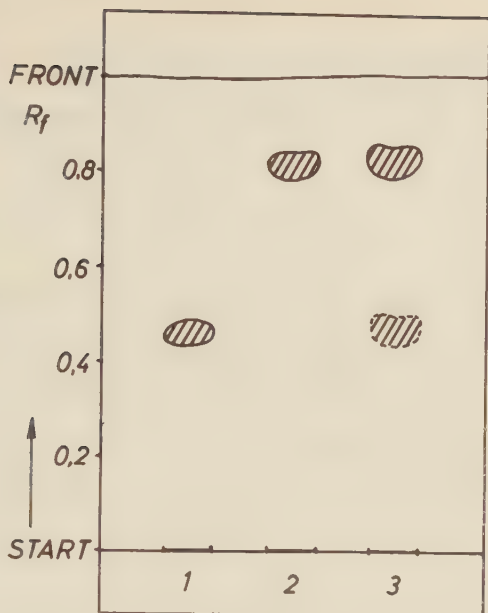


Abb. 7

Überprüfung der Methylierung der Hydroxy-FS

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2)

- 1 = 18 = OH^{12} frei
 2 = 18 = OH^{12} ME
 3 = 18 = OH^{12} teilweise methyliert

5. Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester

Zur DC Trennung der ME übernahmen wir das von VIOQUE und HOLMAN³⁷⁾ benutzte Laufmittel, die hiermit die FS von Ricinus-, Artemisia- und Veroniaölen untersuchten. Wir entwickelten die Methode weiter zur Identifizierung der Derivate und Begleitstoffe und verbesserten das Detektionsverfahren. Als Systeme für die Kieselgel-DC dienten Hexan-Äther-Gemische.

Darin haben gesättigte und ungesättigte FS den gleichen R_f -Wert. Hydroxy-FS werden nach unseren Erfahrungen nur nach Anzahl, nicht nach der Stellung der Hydroxy-Gruppe getrennt, wie dies bei der DC der freien FS der Fall ist (siehe IV., A. 3., S. 17). Durch Erhöhung des Ätheranteils zum System wird eine Erhöhung der R_f -Werte erzielt. Zur weiteren Identifizierung stellten wir Acetylprodukte her. Ihr R_f -Wert liegt zwischen denen der Hydroxy-FS und der n-FS (Abb. 8, S. 27).

Außerdem benutzten wir die DC zur Überprüfung und Reinigung der Acetoxy-FS und TMS-Derivate, die beide die gleiche Laufhöhe haben, sowie der Methoxysäuren, die knapp darüber liegen (Abb. 8, S.27).

Auch andere FS mit Sauerstoff-Funktionen, wie Keto- und Epoxysäuren, sowie Dicarbonsäuren und Alkohole können auf der Platte identifiziert werden (Abb. 9, S. 28). Aliphatische Alkohole und Mono-Hydroxy-FS haben den gleichen R_f -Wert und müssen im Analysengang durch IR-Spektroskopie unterschieden werden. Auch Epoxy- und Ketosäuren haben dieselbe Laufhöhe. Eine Differenzierung ist mit Diphenylcarbazon⁶⁹⁾ möglich, wobei Ketosäuren gelb angefärbt werden.

Zur Identifizierung der getrennten Substanzen verwendeten wir wieder den Fluoreszenzindikator P_1 (siehe A. 6., präparative Dickschichtchrom., S. 29). Anschließend muß auf Begleitstoffe, die im R_f -Bereich der Hydroxy-FS liegen, geprüft werden. Sterine werden mit Liebermann-Burchard-Reagenz⁶⁸⁾,

Phenole mit Echtblausalz B und Kalilauge⁶⁹⁾ differenziert nachgewiesen.

Mit demselben Laufmittel können nach MORRIS und WHARRY⁷⁰⁾ auf mit 5% Silbernitrat imprägnierten Kieselgelplatten cis-trans isomere Hydroxy-FS getrennt werden.

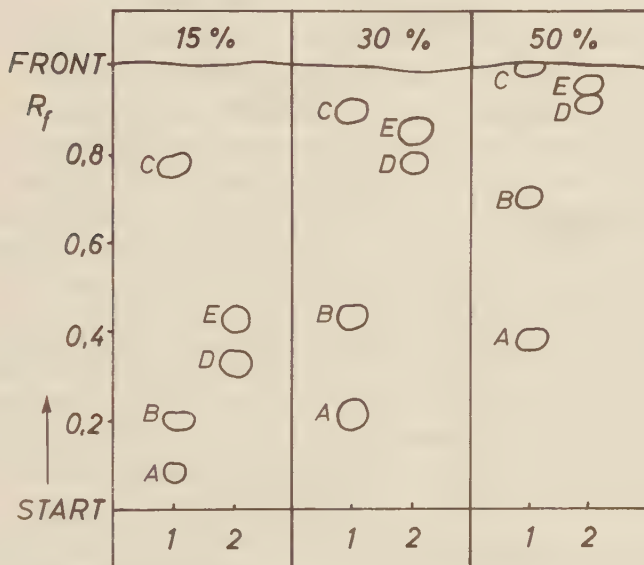


Abb. 8

Dünnschichtchromatographie der Methylester

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Benzin mit Ätherzusatz (15%, 30%, 50%)

1 = A = Dihydroxy-FS

B = Monohydroxy-FS

C = n-FS

2 = D = Mono-Acetoxy-FS und Mono-TMS-FS

E = Mono-Methoxy-FS

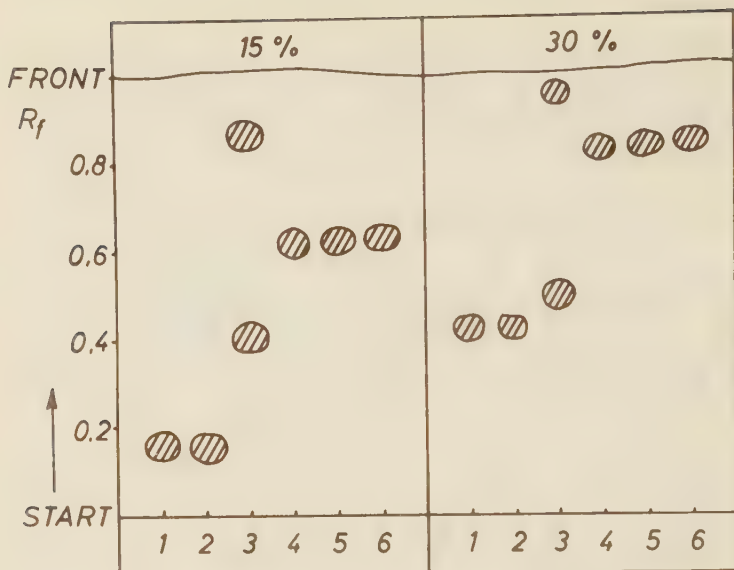


Abb. 9

Dünnschichtchromatographie der ME

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Benzin mit Ätherzusatz (15% und 30%)

- 1 = Mono-Hydroxy-FS ($18=O^{12}OH$)
- 2 = Alkohole ($17=O^{12}OH$)
- 3 = Dicarbonsäuren (C_8 R_f 0.4)
und Monocarbonsäuren ($18=O$ R_f 0.85)
- 4 = Keto-FS ($18=O^{12}$)
- 5 = Epoxy-FS ($18=O^{12-13}$)
- 6 = FS-Mischung von 4 und 5

Fraktionierung nach Stoffgruppen

Da die von MILBURN und TRUTER¹⁴⁾ angegebene und von KISHIMOTO und RADIN¹⁵⁾ verbesserte K u p f e r c h e - l a t f ä l l u n g nur für α -Hydroxy-FS anwendbar ist, müssen andere Verfahren herangezogen werden.

Zunächst verwendeten wir die S ä u l e n c h r o m a t o - g r a p h i e . Nach einigen Versuchsreihen gelang uns die Übertragung der DC der freien FS und auch der FS-ME auf Säulen. Wir konnten damit Ricinolsäure, Dimorphecolsäure und α -Hydroxy-FS aus Gehirn-Cerebrosid isolieren. Da jedoch bei der Säulenchromatographie große Lösungsmittelmengen benötigt werden, die einzelnen Fraktionen eingengt und DC untersucht werden müssen und mit großen Substanzverlusten zu rechnen ist, wählten wir die p r ä p a r a t i v e D i c k s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i e .

Die Verluste sind hier, wie wir durch Testversuche leicht feststellen konnten, gering (2%). Weitere Vorteile sind eine wesentlich schnellere Auftrennung und somit eine verkürzte Kontaktzeit mit Kieselgel, erheblich geringerer Verbrauch von Lösungsmitteln und Wegfall der DC von Fraktionen. Somit ist diese Methode schonender, schneller und bequemer durchführbar als die Säulenchromatographie und nur mit minimalen Verlusten behaftet.

Voraussetzung für diese Methode ist aber ein Indikator, der die Substanzen deutlich sichtbar macht, sie chemisch nicht verändert und selbst nicht miteluiert wird. Joddampf und aggressive Sprühreagenzien kommen somit nicht in Betracht. Anfängliche Versuche mit Kieselgel HF 254 Merck schlugen fehl. Gut brauchbar fanden wir schließlich den von TSCHESCHE und Mitarb.⁷¹⁾ für verschiedene Substanzen benutzte Fluoreszenzindikator P_1 (= 3 Hydroxy-pyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium^{*}).

Pyranin ist ein Geschenk der Farbenfabriken BAYER, Leverkusen.

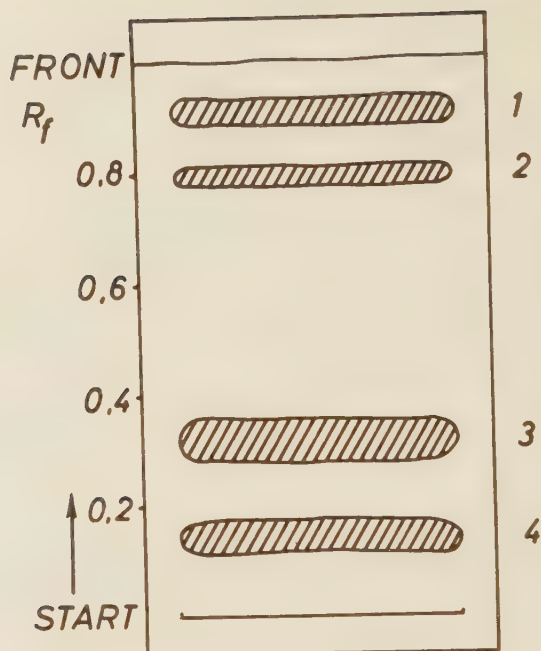


Abb. 10

Präparative Dickschichtchromatographie der Methylester

Adsorbens: Kieselgel H

Laufmittel: Benzin-Äther (7:3)

1 = n-FS

2 = Epoxy-FS und Keto-FS

3 = Mono-Hydroxy-FS

4 = Di-Hydroxy-FS

Der Indikator ist in Wasser gut, in Aceton schlecht, in den restlichen organischen Lösungsmitteln unlöslich. Dies hat den Vorteil, daß das Adsorbens leicht imprägniert werden kann und beim Herauslösen der getrennten Substanzen mit Chloroform der Leuchtstoff im Kieselgel zurückbleibt.

Durch eine Versuchsreihe ermittelten wir, daß pro Platte (40 x 20 cm) 450 mg FS-Gemisch noch gut getrennt werden. Je nach Wahl des Laufmittels können freie FS in 1 bis 1 1/2 Stunden, FS-ME in 45 Minuten getrennt werden (siehe A. 3., S. 17 und A. 5., S. 26). Nach Abdunsten des Laufmittels betrachtet man die Platte unter dem UV-Licht und umrandet die hellblau fluorescierenden Zonen mit einer Präpariernadel (Abb. 10, S.30). Anschließend werden die Zonen der Platte mit einem Spatel entnommen und dreimal mit Chloroform extrahiert. Damit ist eine quantitative Rückgewinnung gewährleistet.

7. Fraktionierung nach der Kettenlänge

Hier kommen nur verteilungschromatographische Trennungen in Frage, da in der Adsorptionschromatographie eine Differenzierung nur nach funktionellen Gruppen erfolgt.

a) Präparative Gaschromatographie

Vorversuche zeigten, daß bei der Übertragung der analytischen Methode in den präparativen Maßstab die Retentionszeiten um das Drei- bis Vierfache verlängert werden.

Um diese langen Retentionszeiten zu vermeiden, verwendeten wir nur TMS-Derivate (siehe IV. B. 4., S.41 und 5. S. 49).

Zuerst versuchten wir die Isolierung von Ricinolsäure aus ihren Gesamt-FS. Das ME-Gemisch wurde silyliert und 300 mg pro Charge eingespritzt. Die Isolierung gelang, jedoch traten große Verluste auf. Die anschließende GC Überprüfung zeigte eine nahezu 100%ige Reinheit. Außerdem stellten wir dabei fest, daß sich während der Analyse das TMS-Derivat ganz oder teilweise in das Ausgangsprodukt zurückgebildet hatte. Dies ist jedoch weiterhin nicht störend,

da die isolierten TMS ohnehin regeneriert werden müssen. Um sicher zu sein, daß keine Veränderung der Ricinolsäure eingetreten war, führten wir einen Permanganat-Perjodat-Abbau (siehe IV. B. 1, S.35) durch und verglichen die Spaltprodukte gaschromatographisch mit denen aus reiner Ricinolsäure. Da beide Säuren die gleichen Säurebruchstücke lieferten, war keine Verschiebung der Doppelbindung während der präparativen GC eingetreten.

Um den Substanzverlust zu ermitteln, führten wir mit TMS-Ricinolsäure die präparative GC durch. Wir erhielten etwa 40% der Ausgangsmenge zurück.

Zur Trennung der α -Hydroxy-Homologen aus Rinderhirn-Cerebrosid (C_{18} - C_{26}) verwendeten wir die TMS-Derivate und erniedrigten die Imprägnierung der Säule von 20% auf 15%. Noch weniger zu imprägnieren ist für die präparative GC wenig sinnvoll, da dann gleichzeitig die Beladekapazität der Säule rapide sinkt. Die Temperatur von 215° wurde zunächst beibehalten. Die Substanzauftrennung zeigte ein starkes "Schmieren" und ab C_{23} verbleiben die Säuren ganz in der Säule.

Daraufhin erhöhten wir die Säulentemperatur auf 250° und verkürzten die Säule auf die Hälfte (1 m). Trotz dieser veränderten Versuchsbedingungen gelang uns auch damit keine vollständige Trennung der langkettigen Hydroxy-FS.

Somit ist die Übertragung der analytischen GC auf präp. Maßstab nur im beschränkten Umfang möglich. Hydroxy-FS bis zu einer Kettenlänge von C_{20} können aber noch gut getrennt werden.

b) Präparative Verteilungschromatographie

Da bei der präp.GC sehr hohe Verluste auftreten und nicht alle α -Hydroxy-Homologe getrennt werden können, versuchten wir dieses Problem durch Plattenchromatographie zu lösen.

Das von POHL⁶⁵⁾ benutzte Trennsystem für gesättigte und ungesättigte n-FS, bestehend aus Ameisensäure-Acetonitril- (2:2:1)
Aceton

auf mit 10% Paraffin imprägnierten Kieselgur-Kieselgel (7:3) schichten, führte nur zu einem Teilerfolg. Von C_{14} α -Hydroxy-FS bis C_{22} erhielten wir eine gute Trennung, während C_{22} - C_{26} nicht mehr getrennt werden konnten (Abb. 11, I, S. 34).

Ein zweiter Versuch nach den Angaben von KAUFMANN und SUKO⁷³⁾ führte zu einer Trennung von C_{14} bis C_{24} Hydroxy-FS, C_{25} und C_{26} Hydroxy-FS konnten jedoch nicht genau lokalisiert werden. (Abb. 11 II, S. 34). Als Laufmittel diente Essigsäure-Wasser (9:1) mit 75% Zusatz an Imprägnierungsmittel. Als Adsorbens diente mit Paraffin-Petroläther (5:95) imprägniertes Kieselgur (Abb. 11 III, S. 34).

Da Kieselgur G Dickschichtplatten sehr schwer herstellbar sind, versuchten wir eine Mischung aus Kieselgel-Kieselgur (3:7) mit obigem Laufmittel. Die Auftrennung wurde dadurch nicht nachteilig beeinflusst.

Zum Nachweis verwendeten wir Joddampf, da auf hydrophoben Schichten der Leuchtstoff P_1 nicht verwendet werden kann. Die einzelnen Fraktionen müssen herausgelöst und mit Chloroform eluiert werden. Um das mitisolierte Paraffin beseitigen zu können, muß mit Lauge verseift, das Paraffin als Unverseifbarer ausgeschüttelt werden. Sodann säuert man an und trennt die freien α -Hydroxy-FS mit Petroläther ab und methyliert erneut. Eine Übertragung auf Säulen führt zu besseren Ergebnissen, jedoch ist das Verfahren äußerst umständlich.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die präparative GC zur präparativen Auftrennung von homologen Hydroxy-FS, die sich nur in den Kettenlängen unterscheiden, das Mittel der Wahl ist. Allerdings müssen wegen der hohen Verluste, die bei der präparativen GC auftreten, größere Substanzmengen zur Verfügung stehen. In den Fällen, wo die Kettenlängen der Hydroxy-FS über C_{20} hinausgehen, kommt die präparative Verteilungschromatographie auf Dickschichtplatten zur Anwendung, bei der bis zu C_{24} Hydroxy-FS noch gut aufgetrennt werden können. Hydroxy-FS mit noch längeren Ketten können als Einzelsubstanzen nicht mehr gewonnen werden, so daß deren Identifizierung mit Hilfe der analytischen DC und GC durch Vergleiche mit Testsubstanzen und Derivaten geführt werden muß.

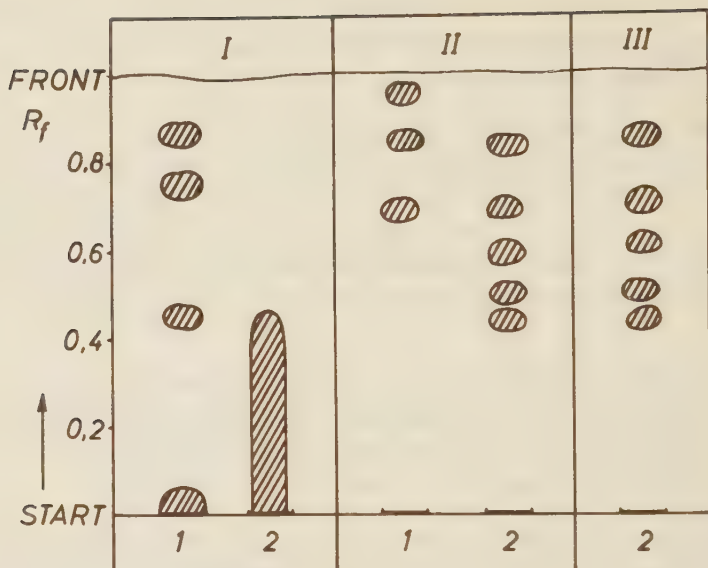


Abb. 11

Verteilungschromatographie der α -Hydroxy-FS-Homologen

1 = α -Hydroxy-FS C_{14} , C_{16} , C_{22} , C_{26} (absteigender R_f)

2 = α -Hydroxy-FS aus Gehirncerebrosid C_{18} , C_{22} bis C_{24}
(absteigender R_f)

I = Kieselgel-Kieselgur (3:7) mit 10% Paraffin
Ameisensäure-Acetonitril-Aceton (2:2:1)

II = Kieselgur mit 5% Paraffin
Essigsäure-Wasser (9:1)

III = Kieselgel-Kieselgur (3:7) mit 5% Paraffin
Essigsäure-Wasser (9:1)

Identifizierung

1. Übertragung und Modifizierung von Identifizierungs-

Methoden für Normalfettsäuren auf Hydroxysäuren

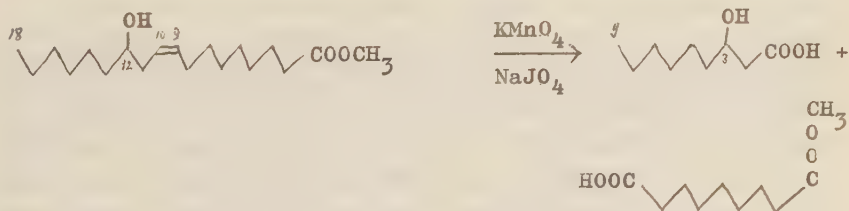
Ebenso wie unter A beschrieben, konnten einige Verfahren der Strukturaufklärung von n-FS direkt oder nach Abänderung übernommen werden.

Neben den Verfahren der Schmelzpunktsbestimmung und Elementaranalyse kann die Alkaliisomerisierung mit anschließender UV-Spektroskopie herangezogen werden. Anhand der charakteristischen UV-Maxima wird dann die Anzahl der Doppelbindungen ermittelt. Durch direkte UV-Messung können konjugierte Hydroxy-FS, wie z.B. Dimorphecolsäure ($18=2\text{OH}^9$) und Alkin-Hydroxy-FS charakterisiert werden.

Um die Lage der Doppelbindung festzulegen, wird ein oxydativer Abbau durchgeführt. Von der in Frage kommenden Methode ist nach unseren Erfahrungen der Permanganat-Perjodat-Abbau nach RUDLOFF⁸¹⁾ dem Ozonid-Abbau überlegen. Die dabei entstehenden Mono- und Dicarbonsäuren identifizierten wir nach Methylierung mittels Gaschrom (siehe unter B. 5., S. 39).

Beim Abbau von Ricinolsäure entsteht z.B.:

β -Hydroxy-nonansäure und Azelainsäure



Um die Anzahl und Kettenlänge der ungesättigten Verbindungen zu ermitteln (siehe B. 5, S. 48), wird eine Hydrierung durchgeführt. Um Doppelbindungen im Mikromaßstab zu hydrieren, verwendeten wir einen PtO_2 -Katalysator und zur partiellen Hydrierung der Dreifachbindung, einen Palladium-Blei-Katalysator⁷⁴⁾. Als Lösungsmittel diente Tetrahydrofuran.

Für eine exakte Strukturaufklärung der Hydroxy-FS sind zusätzlich noch folgende Verfahren erforderlich.

2. Chromsäure-Abbau

Um die Lage der Hydroxy-Gruppe in der FS-Kette zu ermitteln, muß wiederum ein oxydativer Abbau durchgeführt werden.

Die in der Literatur angegebenen Verfahren der Beckmannumlagerung²⁴⁾, der Ketonoxydation zum entsprechenden Ester nach dem Schema der Baeyer-Villiger-Ketenspaltung⁸³⁾ und des Kaliumpermanganat-Abbaues⁴⁰⁾ führten zu keinem Ergebnis.

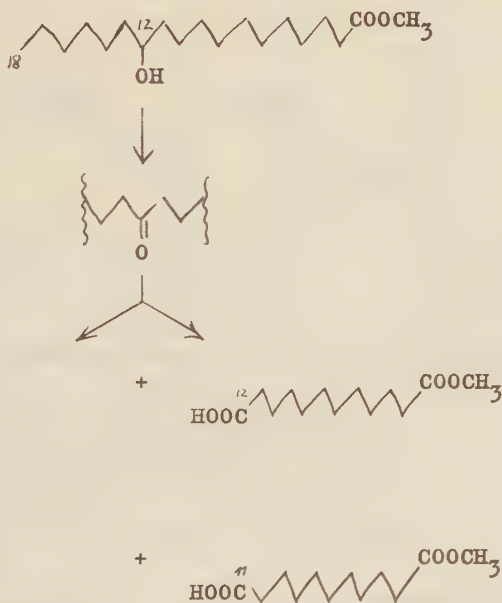
Beim ersten Verfahren ließ sich das Oxim weder mit Schwefelsäure noch mit Polyphosphorsäure zu Amiden umlagern. Die Ketonoxydation scheiterte daran, daß aus Peroxytrifluoressigsäureanhydrid keine Persäure entstanden war, während die Kaliumpermanganat-Oxydation auf der Stufe der Ketosäure stehen blieb.

Ein weiterer Versuch, eine direkte Spaltung mit Chromtrioxyd im Überschuß und bei Siedetemperatur durchzuführen, führte zu zahlreichen Bruchstücken, die nicht identifiziert werden konnten.

Durch Abänderung der Reaktionsbedingungen gelang es uns schließlich, nach den Angaben von MAEKINS und SWINDELLS⁸⁴⁾ den Abbau erfolgreich durchzuführen. Nach der DC Abtrennung der nicht abgebauten Ketosäure (Abb. 12, S. 38) konnten wir die entsprechenden Mono- und Dicarbonsäuren gaschromatographisch gut nachweisen. Diese Abtrennung ist aber nicht unbedingt erforderlich. Sie kann bei sehr wenig Substanzmengen unterbleiben, da unter den gaschromatographischen Bedingungen

für kurzkettige Mono- und Dicarbonsäuren, Ketosäuren in der Säule bleiben und somit den Nachweis nicht stören (Abb. 13, S. 39).

Am Beispiel der hydrierten Ricinolsäure ($18=_{OH}^{12}$) ist nachfolgend der Chromsäure-Abbau dargestellt:



Es entstehen dabei in der Hauptsache zwei Paare von Mono- und Dicarbonsäuren neben geringen Mengen der beiden nächstkürzeren Homologen (Abb. 13, S. 39).

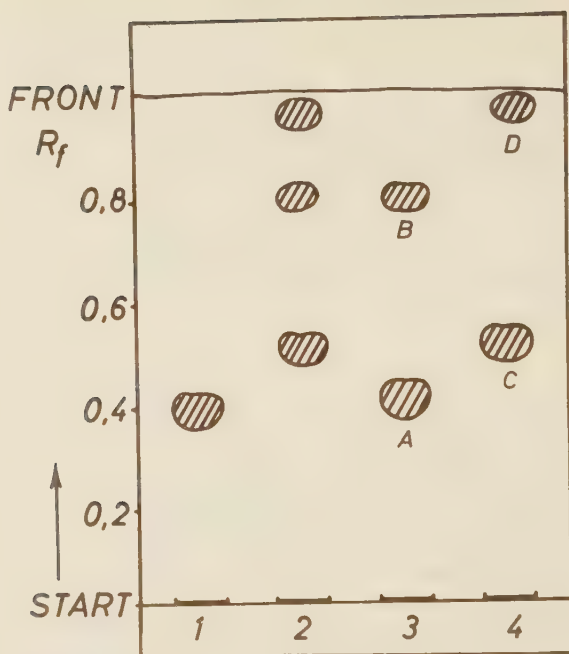


Abb. 12
Chromatogramm des Chromsäureabbaues

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Benzin-Äther (7:3)

- 1 = Ausgangssubstanz hydrierte Ricinolsäure ME ($18=0\text{OH}^{12}$)
- 2 = Reaktionsprodukte
- 3 = Test A = Hydroxy-FS:hydrierte Ricinolsäure ME ($18=0\text{OH}^{12}$); B = Ketosäure ($18=0\text{O}^{12}$)
- 4 = Test C = Dicarbonsäure: Acetalsäure ME ($9=0$);
D = n-FS Stearinsäure ME ($18=0$)

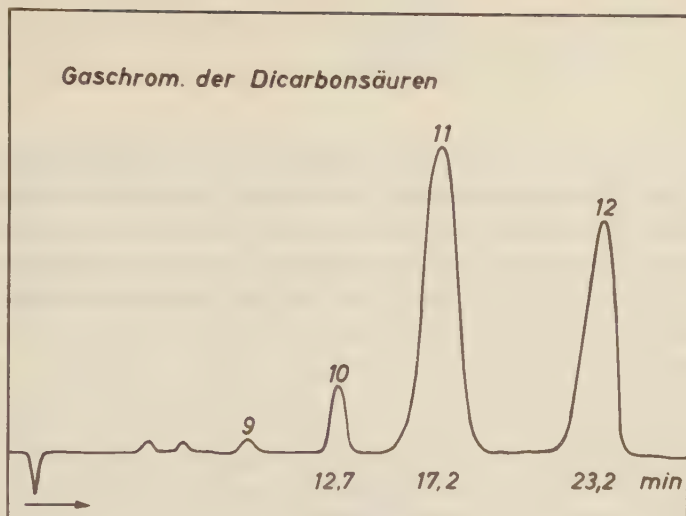


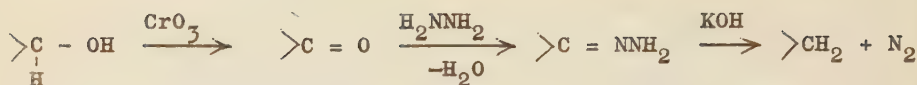
Abb. 13

Gaschromatographie der Dicarbonsäure-Methylester (von C_9 bis C_{12}) auf einer 15% EGSSX-Säule bei 150°

Wolff-Kishner-Reduktion

Durch Hydrierung ungesättigter Hydroxy-FS allein kann die Kettenlänge nicht bestimmt werden, da die Hydroxy-Gruppe je nach Stellung im FS-Molekül die Retentionszeiten bei der GC zu stark beeinflusst. Aus diesem Grunde wird die Hydroxy-Gruppe am zweckmäßigsten durch eine Wolff-Kishner-Reduktion eliminiert.

Dabei werden die Hydroxy-FS hydriert, dann in Ketosäuren überführt und diese mit Hydrazinhydrat und Kalilauge als Katalysator einer direkten Wolff-Reduktion⁸⁵⁾ unterworfen.



Die Hauptschwierigkeit der Mikromethode war, das bei der Reaktion gebildete Wasser sofort zu entfernen, da es eine Rückverwandlung in die sekundäre alkoholische Gruppe bewirkt. Diese Schwierigkeit beseitigten wir durch eine einfache Vakuumanlage, wie sie im experimentellen Teil beschrieben ist (Abb. 47, S. 102).

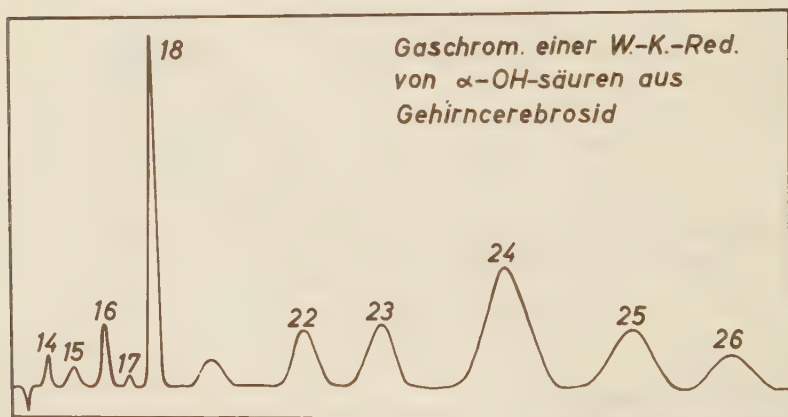


Abb. 14

Gaschromatogramm einer Wolff-Kishner-Reduktion von α-Hydroxy-FS-ME aus Gehirncerebrosid (C₁₄ - C₂₆)

Nach der Reduktion sind die entstandenen gesättigten FS erneut zu methylieren, da die Ester durch Kalilauge gespalten wurden. Wir konnten die Umsetzungen sowohl mit Einzelsubstanzen, als auch mit Gemischen erfolgreich durchführen (Abb. 14).

Reaktionen der funktionellen Gruppen

Zur näheren Charakterisierung und Identifizierung der isolierten Hydroxy-FS ist die Darstellung von Derivaten notwendig.

a) Chromsäureoxydation zu Ketonen

Ketosäuren sind notwendige Zwischenprodukte bei der Aufklärung der Lage der Hydroxy-Gruppe und der Kettenlänge der FS (siehe B. 2., S. 36 und 3., S. 39). Außerdem kristallisieren Ketosäuren gut aus und können daher durch Schmelzpunkt- und Elementaranalysen charakterisiert werden. In der gaschrom. Analyse besitzen sie gegenüber den Hydroxy-FS verkürzte Retentionszeiten (siehe B. 5., S. 44).

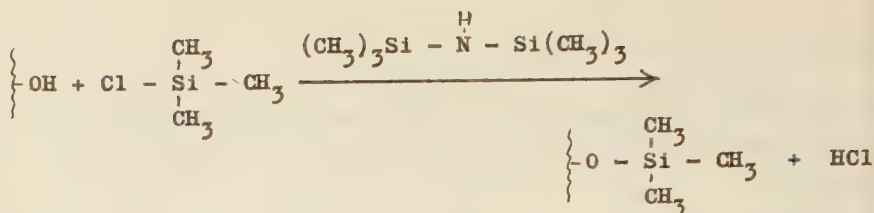
Wir arbeiteten die Methode von CHRISTIE und Mitarb.⁷⁵⁾ zur Mikromethode aus. Ungesättigte Hydroxy-FS müssen dabei vorher hydriert werden. Die Hydroxy-Gruppe wird dann mit Chromtrioxyd bei Zimmertemperatur oxydiert und die Ketosäure mit Petroläther abgetrennt. Die DC und GC Überprüfung ergaben 98 - 100% reine Ketosäuren. Die Umsetzung ließ sich noch mit 5 mg Substanz durchführen.

b) Trimethylsilylierung

TMS-Derivate eignen sich zum selektiven Nachweis der Hydroxy-FS. Als besonderer Vorteil kommt hinzu, daß so die Retentionszeiten verkürzt werden können. Wir verwendeten sie auch in der präp. GC, da dort unveränderte langkettige Hydroxy-FS nicht auftrennbar sind. Zudem haben sie gegenüber anderen Derivaten vor allem für präparative Arbeiten den Vorteil der schnelleren und schonenderen Regenerationsmöglichkeit.

Zur Silylierung wandelten wir die Methode von WOOD und Mitarb.⁷⁶⁾ entsprechend ab.

Die Umsetzung erfolgt mit Hexamethylsilan und Trimethylchlorsilan.



Bei der DC und GC Überprüfung stellten wir fest, daß sich alle Hydroxy-FS mit Ausnahme der α -Hydroxy-FS quantitativ umgesetzt hatten.

Die Silylierung der α -Hydroxy-FS war vermutlich aus sterischen Gründen nur zu etwa 80% erreichbar. Bei einer darauffolgenden zweiten Silylierung erhielten wir etwa 90% Ausbeute.

c) Acetylierung

Die Acetylderivate dienen dem allgemeinen Nachweis einer Hydroxy-Gruppe auf der Dünnschichtplatte und der vergleichenden GC von kurzkettigen Hydroxy-FS im FS-Gemisch.

T a b e l l e 1

Acetylierungsgemisch	Zeit	Temperatur
1) Essigsäureanhydrid-Pyridin	2 Stdn.	100°
2) Essigsäureanhydrid-konc. Schwefelsäure	1 Stde.	100°
3) Essigsäureanhydrid-Äthylacetat-Perchlorsäure	5 Min.	20° 77)
4) Essigsäureanhydrid-Pyridin-p-Toluolsulfonsäure	5 Min.	100° 77)
5) Essigsäureanhydrid-Äthylacetat-p-Toluolsulfonsäure	15 Min.	50° 78)

Während die in der Tabelle 1 unter 1) bis 3) angegebenen Verfahren völlig unbrauchbar waren, erhielten wir mit dem von FRITZ und SCHENK⁷⁷⁾ für Zucker angegebenen Pyridin-p-Toluolsulfonsäure-Verfahren die besten Ergebnisse. Wir konnten damit Dimorphecolsäure ohne Veränderung umsetzen. Diese Methode kann auch zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden.

Eine Verbesserung brachte das von STERTZER und SMULLIN⁷⁸⁾ angegebene Verfahren. Dabei wird das Pyridin gegen Äthylacetat ausgetauscht und die Temperatur erniedrigt. Allerdings muß die Reaktionszeit erhöht werden. Sie ist ebenfalls zur quantitativen Bestimmung geeignet.

Methylierung

Methyläther besitzen auf polaren GC-Säulen längere, auf apolaren noch etwas kürzere Retentionszeiten als TMS-Äther und können somit zur vergleichenden GC herangezogen werden.

Zur Darstellung eignet sich am besten die von KISHIMOTO und RADIN²²⁾ beschriebene Methode. Nach unseren Untersuchungen beträgt die Ausbeute maximal nur 80%, so daß diese Methode für eine Mikromethode nicht sehr geeignet ist. Das Methylprodukt muß über eine Säule bzw. über eine DC-Platte gereinigt werden.

5. Gaschromatographie

a) Entwicklung geeigneter Trennbedingungen

Die Retentionszeiten der FS erhöhen sich in der Reihenfolge verzweigt-kettige und geradkettige Monocarbonsäuren, Epoxy- und Ketosäuren zu Mono-Hydroxy- und Di-Hydroxy-FS. Da Hydroxy-FS sehr hohe Retentionszeiten besitzen, waren die üblichen Säulenfüllungen und Arbeitstemperaturen für uns nicht verwendbar.

Mit einer 15% EGSSX-Säule und Erhöhung der Temperatur von 175° auf 215° gelangen Trennungen bis zu C_{20} Hydroxy-FS. Deshalb verringerten wir die Imprägnierung. Mit einer 5% LAC-2R-446-Säule erreichten wir schließlich optimale Trennbedingungen für Hydroxy-FS bis zu einer Kettenlänge von C_{26} (Abb. 15, S. 45). Somit lassen sich auf polaren Säulen Gesamtanalysen durchführen.

Zur genauen Identifizierung der Säuren soll zusätzlich auf einer apolaren Säule chromatographiert werden. Mit der für n-FS üblichen 16% Apiezon L-Säule gelang uns bei höherer Temperatur (215°) eine Auftrennung bis zu C_{18} Hydroxy-FS. Erniedrigt man die Imprägnierung bis auf 3% und reduziert die Säulenlänge von zwei auf einen Meter, so ist auch eine Gesamtanalyse auf einer apolaren Säule möglich (Abb. 16). Sind kurzkettige Hydroxy-FS zu analysieren, muß die Säulentemperatur erniedrigt oder die Imprägnierung erhöht werden.

Anhand eines Gemisches von sechs C_{18} Isomeren sind die Trennbedingungen der von uns verwendeten Säulen gezeigt (Abb. 17, S. 46).

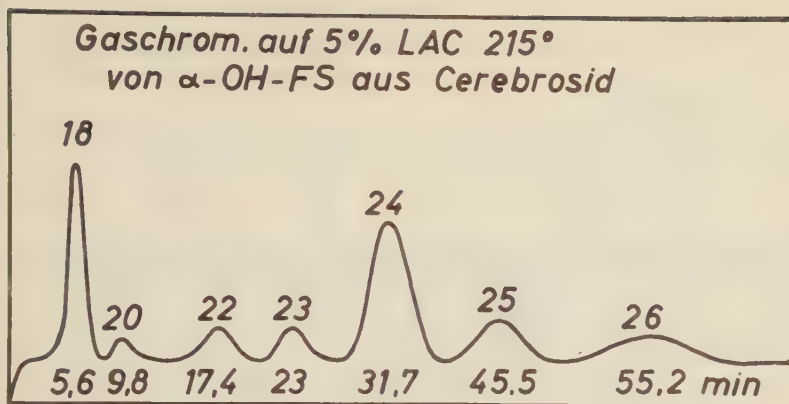


Abb. 15

Gaschromatogramm von α -Hydroxy-FS-ME aus Gehirncerebrosid auf einer 5% LAC-Säule bei 215° ($C_{18} - C_{26}$)

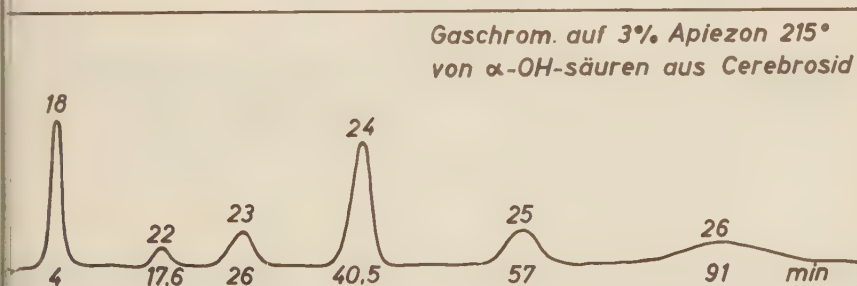


Abb. 16

Gaschromatogramm von α -Hydroxy-FS-ME aus Gehirncerebrosid auf einer 3% Apiezon-Säule bei 215° ($C_{18} - C_{26}$)

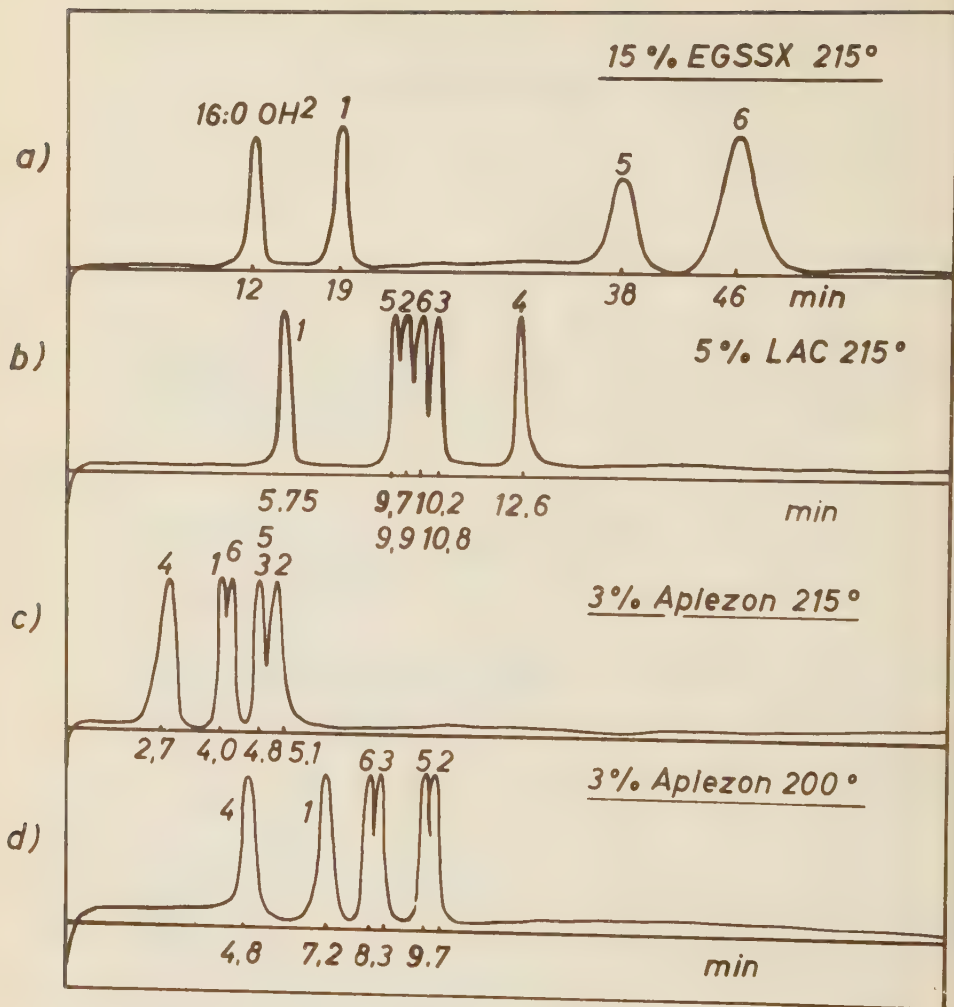


Abb. 17

Gaschromatogramme der ME von

- 1 = 18=OH²₉
- 2 = 18=OH⁹₉
- 3 = 18=OH⁹₉
- 4 = 18=OH⁷₉
- 5 = 18=OH¹²₁₂
- 6 = 18=OH¹²₁

mit einer Säule:

- a = 15% EGSSX bei 215°
- b = 5% LAC bei 215°
- c = 3% Apiezon bei 215°
- d = 3% Apiezon bei 200°

Diskussion der Abb. 17, S. 46:

- a) Zu lange Retentionszeiten und deshalb nur für kurzkettige Hydroxy-FS verwendbar.
- b) Stellungsisomere (1, 2, 5) werden nur teilweise getrennt, jedoch gute Differenzierung nach Anzahl der Doppelbindung (2, 3, 4 und 5, 6).
- c) Zur Differenzierung der C₁₈ Isomeren ist die Temperatur zu hoch gewählt. Nach Erniedrigung der Temperatur um 15° (siehe d)), gute Trennungen nach der Zahl von Doppelbindungen (Säure 2, 3, 4 und 5, 6). Stellungsisomere (2 und 5) haben annähernd die gleichen Retentionszeiten, ebenso die entsprechenden ungesättigten Säuren (3 und 6). Diese müssen durch einen Chromsäureabbau und DC der freien Säuren identifiziert werden.

T a b e l l e 2

Säure	Retentionszeiten der C ₁₈ Isomere				
	a)	b)	c)	d)	
1	19	5.75	4.0	7.2	Min.
2		9.9	5.1	9.7	Min.
3		10.8	4.8	8.3	Min.
4		12.6	2.7	4.8	Min.
5	38	9.7	4.8	9.6	Min.
6	46	10.2	4.15	8.15	Min.

Gaschromatographie der Derivate

α. Hydrierte Säuren

Sind in einem Substanzgemisch ungesättigte FS vorhanden, so kann nach Hydrierung und Vergleich der beiden Chromatogramme genau ausgesagt werden, wieviele FS ungesättigt sind. Wie Abb. 18, S. 48, zeigt, verschwinden die Peaks der ungesättigten Hydroxy-FS, während sich die Retentionsvolumina ihrer stellungsgleichen gesättigten Hydroxy-FS erhöhen.

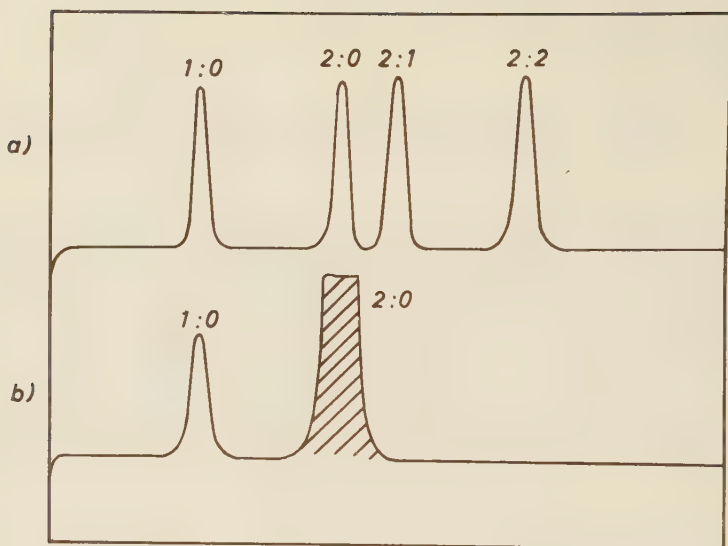
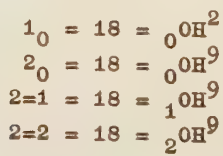


Abb. 18

Gaschromatogramm von a = unbehandeltem Gemisch

b = hydriertem Gemisch



Vermutet man Acetylenensäuren, so wird die Dreifachbindung selektiv zu einer Zweifachbindung hydriert. Wir hydrierten die Acetylen-FS von *Helichrysum bracteatum* partiell mit dem Lindlar-Katalysator⁷⁴⁾ und konnten wieder durch GC Vergleich des hydrierten und nicht hydrierten FS-Gemisches die Lage der Acetylenpeaks feststellen.

Acetate und Methyläther

Liegen n-FS und Hydroxy-FS im Gemisch vor, so werden die Hydroxy-FS durch Vergleich mit einem acetyliertem Gemisch charakterisiert. In der Regel haben Acetoxysäuren höhere Retentionszeiten (Ausnahme: Ricinolsäure). Die Retentionszeiten der Hydroxy-FS erhöhen sich, während die der n-FS gleich bleiben, was in Abb. 19, S. 50, am Beispiel einer n-FS-Mischung mit α -Hydroxypalmitinsäure gezeigt wird.

Die Methyläther ergaben verkürzte Retentionszeiten. Dadurch lassen sich langkettige Hydroxy-FS leichter gaschromatographisch nachweisen (Abb. 20, S. 51).

Trimethylsilyläther

Sie haben gegenüber den Methoxysäuren auf polaren Säulen noch kürzere Retentionszeiten und sind vor allem schneller darstellbar (Abb. 20 c), S. 51).

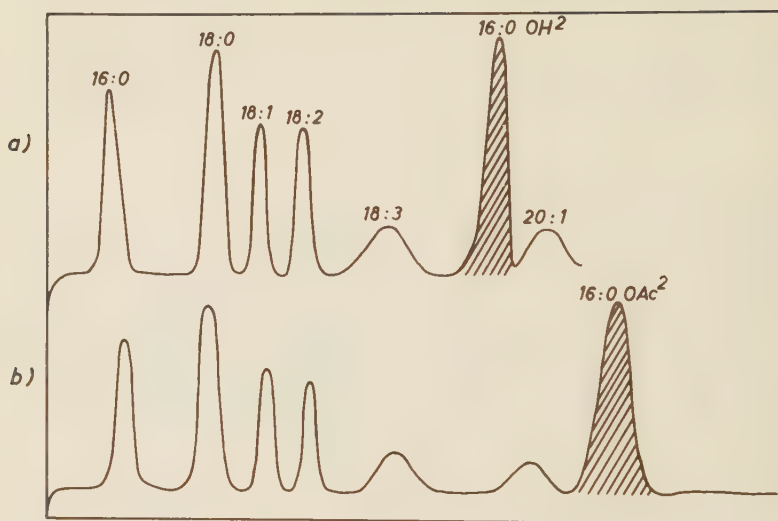


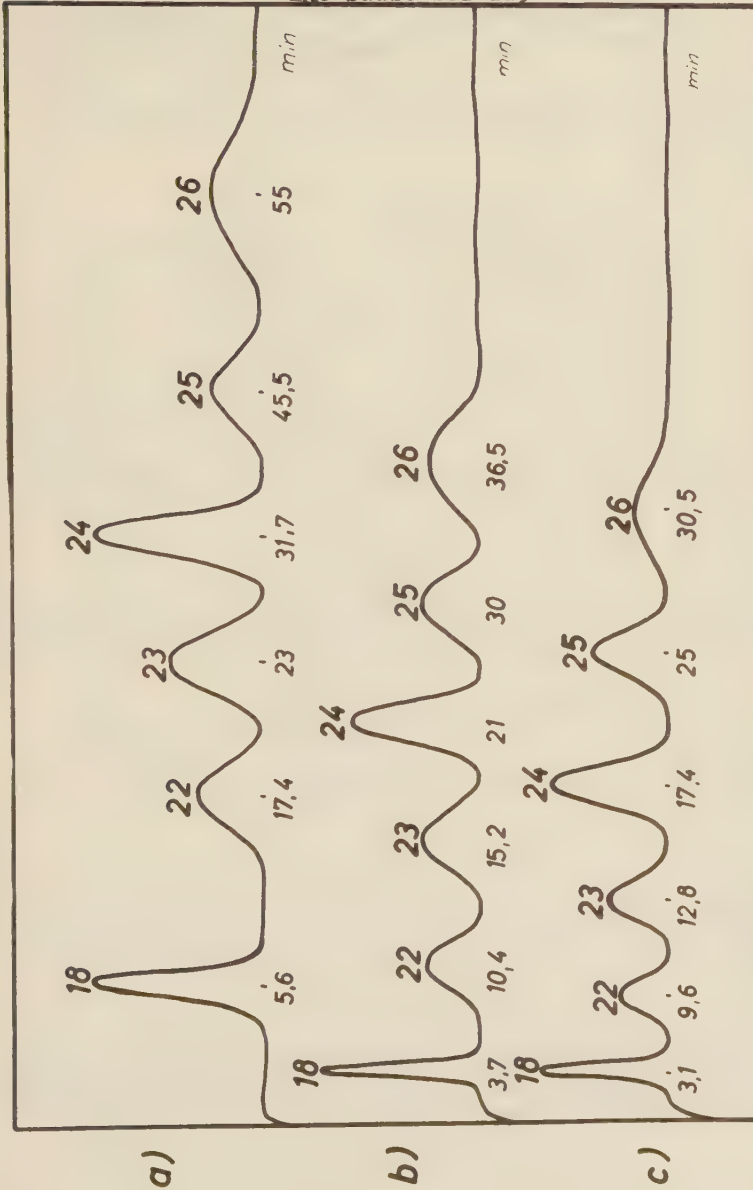
Abb. 19

Gaschromatogramm von a = unbehandeltem

b = acetyliertem Gemisch

Abb. 20

Gaschromatogramme von α -Hydroxy-FS-ME (C_{18} - C_{26}) auf einer 5% LAC-Säule bei 215°



c) = silyliert

b) = methyliert

a) = unbehandelt

a : b : c = 1 : 0.66 : 0.55

Bei unseren Versuchen stellten wir fest, daß α -Hydroxy-FS und ihre TMS-Derivate auf der apolaren Apiezon-Säule gleiche Retentionszeiten besitzen. Während alle übrigen Hydroxy-FS eine Verschiebung zeigen, verändern sich die α -Hydroxy-FS nicht (Abb. 21). Damit ist es erstmals gelungen, einzelne Hydroxy-FS in Hydroxy-FS-Gemischen gaschromatographisch nachzuweisen.

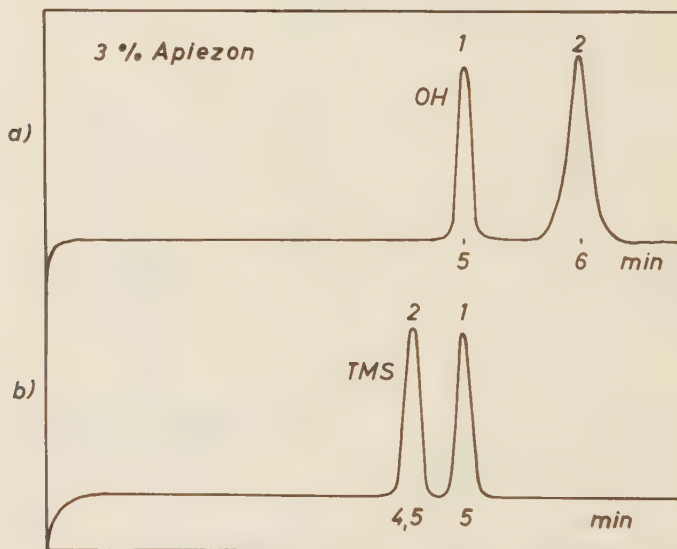


Abb. 21

Gaschromatogramm von 1 = 18 = ${}^0\text{OH}^2$ und 2 = 18 = ${}^1\text{OH}^{12}$ a) vor und b) nach einer Silylierung auf einer Apiezonsäule

Die unterschiedlichen Retentionszeiten der Derivate seien zum Schluß am Beispiel der α -Hydroxypalmitinsäure und Ricinolsäure gezeigt (Abb. 22a, S. 53).

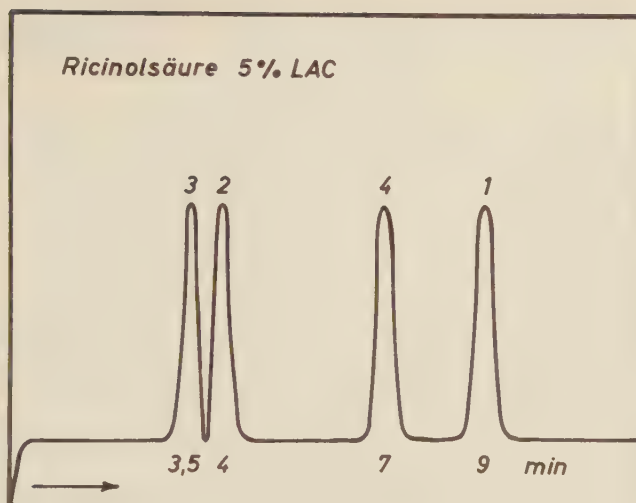


Abb. 22a

Gaschromatogramm der Derivate auf einer 5% LAC-Säule

- 1 = Ricinolsäure-ME ($18=_{1}\text{OH}^{12}$)
- 2 = Methoxy-ME
- 3 = TMS-ME
- 4 = Acetoxy-ME

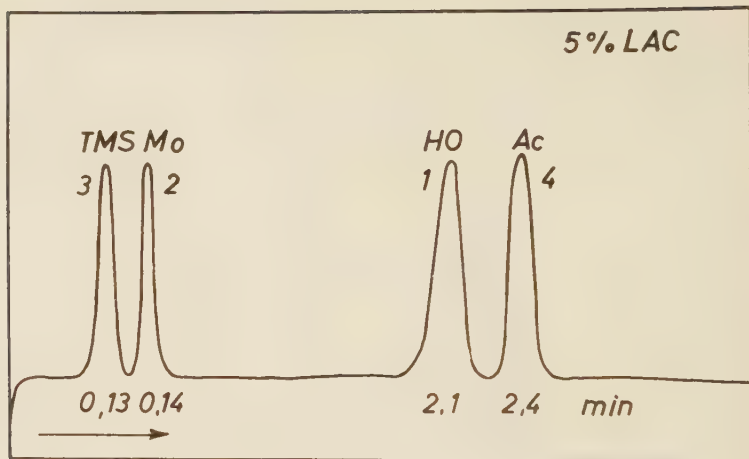


Abb. 22b

Gaschromatogramm der Derivate auf einer 5% LAC-Säule

1 = α -Hydroxyplamitinsäure-ME ($16=_{\text{O}}\text{OH}^2$)

2 = Methoxy-ME

3 = TMS-ME

4 = Acetoxy-ME

IR-Spektroskopie

Diese ist in erster Linie zur Identitätsprüfung der Hydroxy-FS verwendbar. Zur Strukturaufklärung kann sie nur im beschränkten Maße herangezogen werden.

Hydroxy-FS zeigen grundsätzlich die gleichen Spektren wie n-FS (Abb. 23, S. 56) mit Ausnahme einer zusätzlichen Bande bei 2.95μ (Tab. 3 und Abb. 24, S.56). Eine Unterscheidung zwischen Hydroxy-FS und Keto-FS kann leicht getroffen werden, da Ketosäuren (Abb. 25, S.56) statt der fehlenden OH-Valenzschwingung bei 2.95μ eine zusätzliche C=O-Valenzschwingung bei 5.9μ besitzen. Epoxysäuren (Abb. 26, S.57) ergeben im übrigen das gleiche Spektrum wie n-FS, da die C-C-O stretching-Schwingungen bei 11.8 und 12.1μ kaum sichtbar sind.

Die Differenzierung gegenüber Alkoholen (Abb. 27, S.57) ist einfach, da diese neben der OH-Valenzschwingung bei 2.95μ zusätzlich eine OH-Bande bei 9.5μ zeigen. Außerdem fehlen bei 5.8μ C=O Valenz- und im Bereich von 8.0 bis 8.6μ die der Estergruppe zugeordneten C=O-Bande. Ein analoges Spektrum zeigen die Sterine (Abb. 28, S.57), die die häufigsten Begleitstoffe der Hydroxy-FS sind.

T a b e l l e 3

μ	Schwingungsbande
2.95	OH-Valenz
3.3	CH=CH
3.4	CH-Valenz asymmetrisch
3.5	CH-Valenz symmetrisch
5.75	C=O-Valenz Ester
(5.9	C=O-Valenz Keto)
6.05	CH=CH
6.85 + 6.95	CH ₂ -Deformation
7.35-7.4	CH ₂ -Deformation
8.05	C-O-Valenz Methylester
8.3-8.4	C-O-Valenz-Methylester
8.5-8.6	C-O-Valenz-Methylester
(9.5	CH ₂ OH alkoholisch)
13.9	CH ₂ -rocking oder
13.7 + 13.9	CH ₂ -rocking

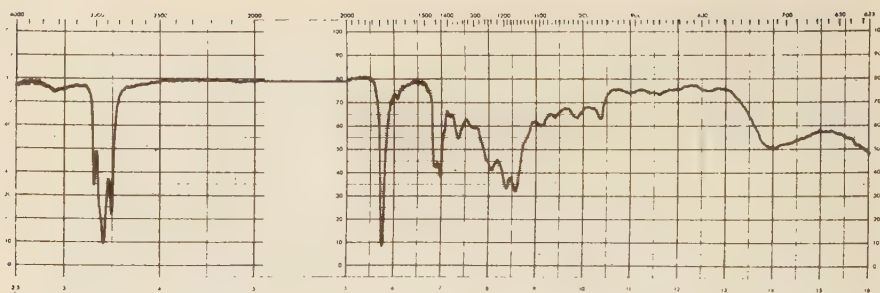


Abb. 23
IR-Spektrum des Linolensäure-ME ($18=3$)

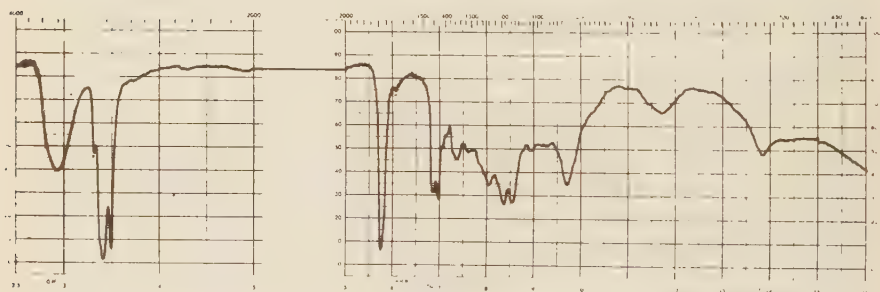


Abb. 24
IR-Spektrum des Ricinolsäure-ME ($18=1\text{OH}^{12}$)

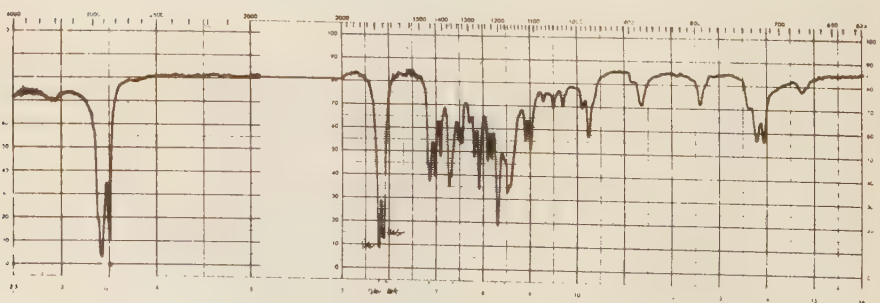


Abb. 25
IR-Spektrum des Octadecan-12-Ketosäure-ME ($18=0^{12}$)

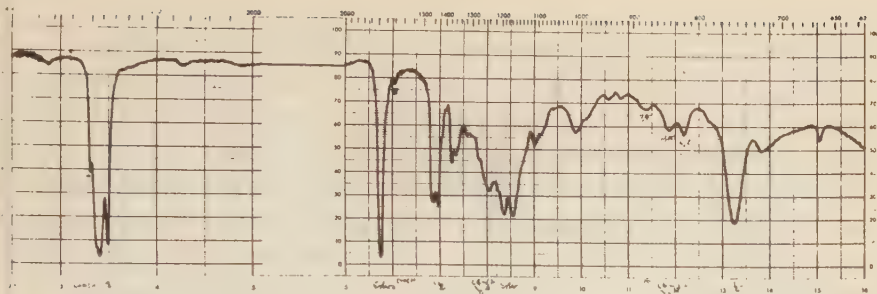


Abb. 26

IR-Spektrum des Vernolsäure-ME ($18=_{10}^{12-13}$)

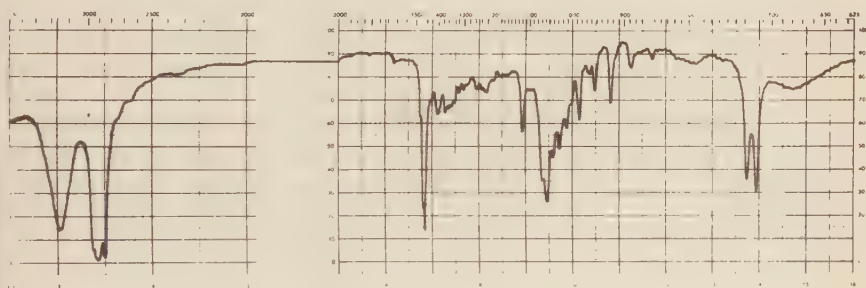


Abb. 27

IR-Spektrum des Heptadecanol-1

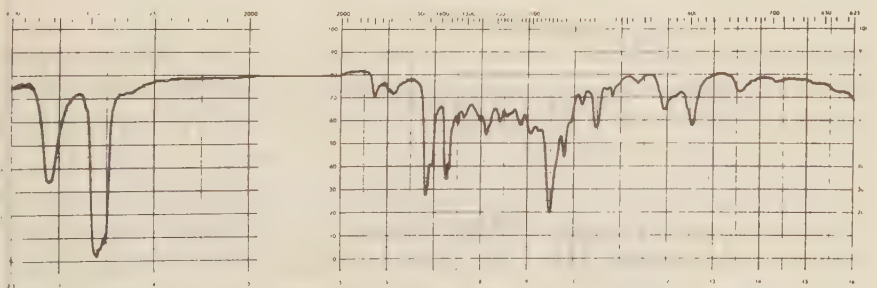


Abb. 28

IR-Spektrum des Cholesterols

Neben der Angabe der funktionellen Gruppen können auch Doppelbindungen, die zwei kleine Bande bei 3.3 und 6.05 μ zeigen (Abb. 23, 24, 26, S. 56 u. 57), identifiziert werden. Weiterhin beobachteten wir, daß bei gesättigten FS die CH_2 -Deformationsschwingungsbande bei 6.85 μ intensiver und bei 6.95 μ schwächer sind (Abb. 27, S. 57 und Abb. 42, S. 78), und sich bei ungesättigten FS das Intensitätsverhältnis umgekehrt verhält (Abb. 23, 24, 26, S. 56 u. 57). Die Anzahl der Doppelbindungen drückt sich im Intensitätsverhältnis dieser beiden Bande aus. Bei guter Auflösung des Bereiches zwischen 7.4 bis 8.5 μ kann durch zählen der Bande und Multiplikation mit Zwei die Anzahl der C-Atome des unsubstituierten Teils der Kette ermittelt werden (Abb. 25, S. 56). Der Fingerprint-Bereich, der häufig zur Bestimmung der Anzahl und Art der Mehrfachbindung herangezogen wird, liefert nach unseren Erfahrungen wenig Informationen.

Für feste FS sind KBr-, für halbfeste und flüssige FS Kapillarmessungen am besten geeignet. Lösungsmittelspektren (Chloroform) ergeben durch Lösungsmittelleffekte verwaschene und verschobene Bande.

7. Kernresonanz-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie benötigt zwar im Gegensatz zur IR-Spektroskopie größere Substanzmengen, liefert aber mehr Strukturangaben.

Doppelbindungen (Abb. 31, S. 60 und Abb. 34, S. 62) und funktionelle Gruppen werden gut angezeigt und sind leicht untereinander zu unterscheiden. Zwar liegt das Signal für die Hydroxylgruppe nie unverändert im gleichen Feldbereich (Abb. 30, 31, S. 60 und Abb. 32, S. 61), aber durch D_2O -Austausch oder Vergleich mit Derivaten (TMS, Acetate) kann diese eindeutig lokalisiert werden (Abb. 30, S. 60). Durch diese Verschiebung der Hydroxy-Bande ist es andererseits möglich, Aussagen über die Lage der Hydroxy-Gruppe im Molekül zu machen.

T a b e l l e 3

(1)	0.9 - 1.0 PPM	End-CH ₃	(1)
(2)	1.3	-CH ₂ -	(2)
(3)	2.2 + 2.3	α-CH ₂ -	(2)
(4)	3.6	-OCH ₃ , -OCH ₂ -	(3)
(5)	5.3 - 5.6	-CH=CH-	(5)
	nicht konstant	-OH	(3)
			(3)
			C=O
			OCH ₃

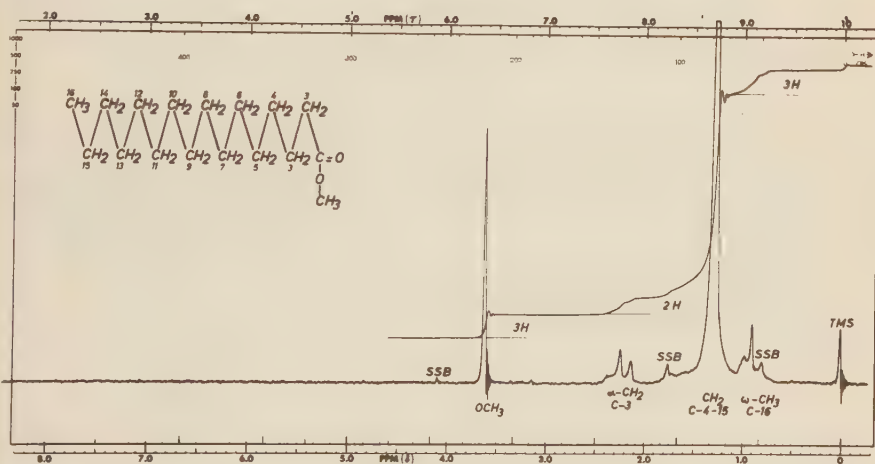


Abb. 29

NMR-Spektrum des Palmitinsäure-ME (16=0)

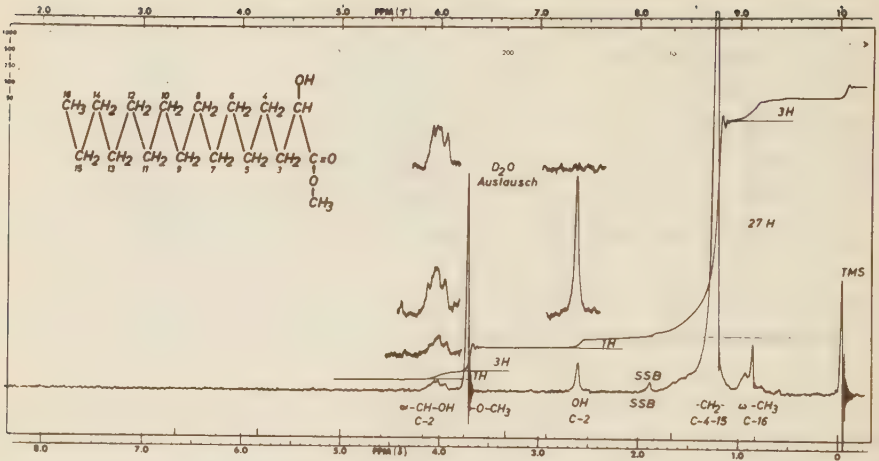


Abb. 30

NMR-Spektrum des α -Hydroxypalmitinsäure-ME (16=OH²)

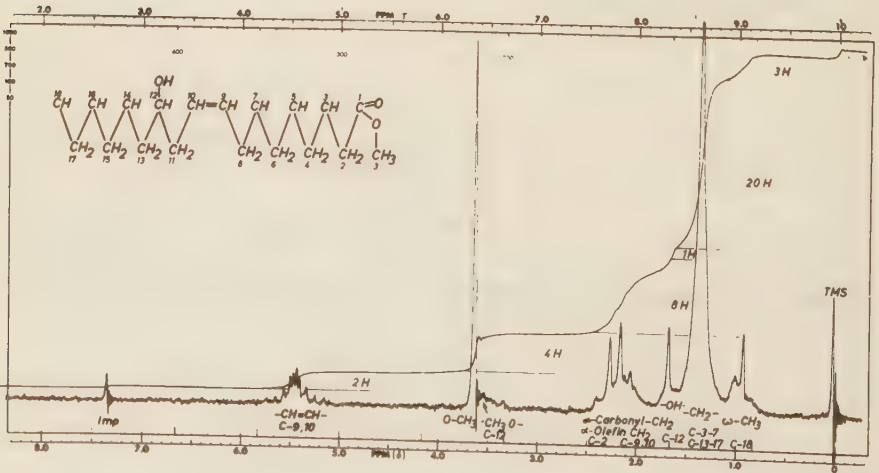


Abb. 31

NMR-Spektrum des Ricinolsäure-ME (18=1OH¹²)

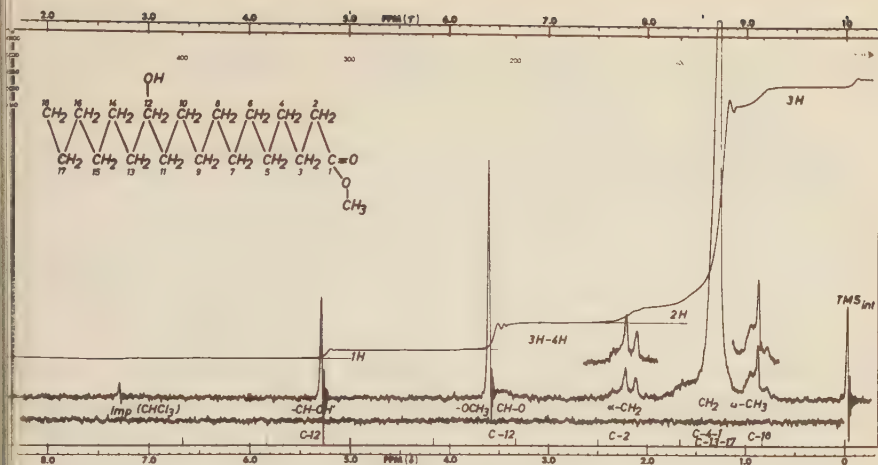


Abb. 32

NMR-Spektrum des hydrierten Ricinolsäure-ME (18=OH¹²)

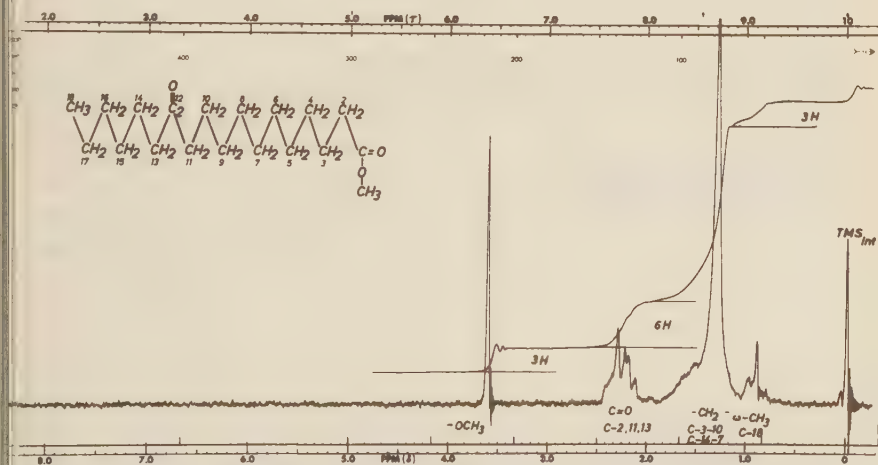


Abb. 33

NMR-Spektrum des 12-Keto-octa-decansäure-ME (18=O¹²)

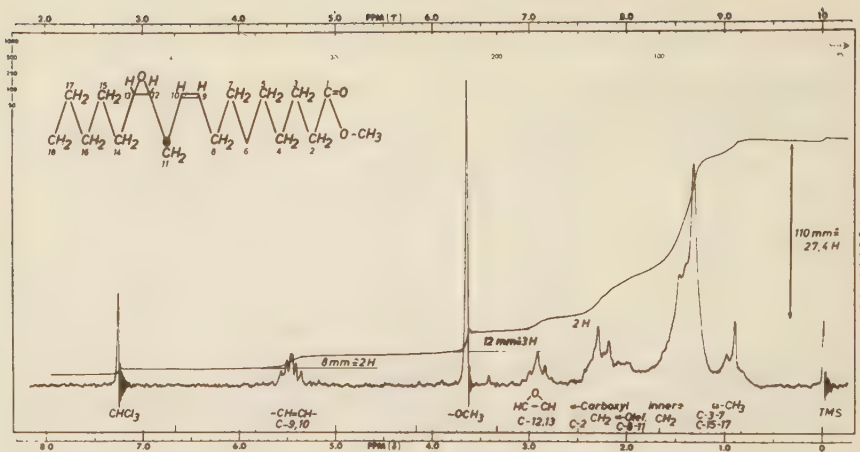


Abb. 34

NMR-Spektrum des 12,13-Epoxy-octa-decansäure-ME
($18=10^{12-13}$)

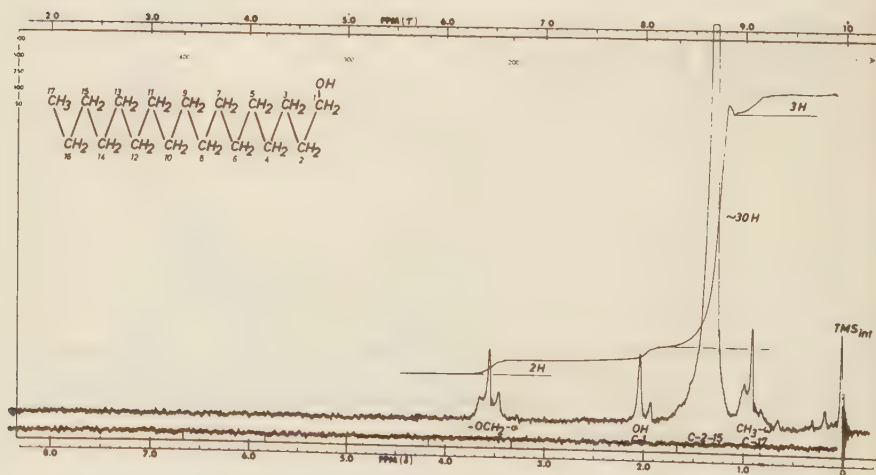


Abb. 35

NMR-Spektrum des Heptadecanols

Diskussion der Abbildungen:

Bei 30 verschwindet das Signal der α -CH₂, bei 2.2 ppm, da diese mit einer Hydroxy-Gruppe besetzt ist.

Bei 31 tritt das Proton an der Doppelbindung zwischen C₉ und C₁₀ (um 5.5 ppm) auf, verbunden mit der α -olefinischen -CH₂- von C₈ und C₁₁ (bei 2.1 ppm) als Dublett. Da C₂ nicht substituiert ist, tritt das α -CH₂-Triplett (bei 2.3 ppm) wieder auf. Die Hydroxy-Gruppe ist um 1.0 ppm nach höherem Feld verschoben.

Da der Einfluß der Doppelbindung in 32 durch Hydrierung beseitigt ist, ist die Hydroxy-Bande um 3 ppm nach höherem Feld verschoben.

33 hat das gleiche Spektrum wie eine n-FS (29). Der einzige Unterschied besteht darin, daß die Integration des α -CH₂-Triplett bei der Ketosäure 6 Protonen ergibt, da die Carbonyl-Gruppe benachbarten CH₂-Gruppen (C₁₁ und C₁₃) an der gleichen Stelle ein Signal geben, wie die der Carboxyl-Gruppe benachbarten CH₂-Gruppe (C₂).

Die Epoxygruppe in 34 zeigt ein eigenes Triplett, bedingt durch die beiden Protonen an C₁₂ und C₁₃ des Dreieringes (bei 2.9 ppm).

Aliphatische Alkohole in 35 haben ihr Protonentriplett der HOCH₂-Gruppe bei 3.6 ppm, das mit dem -OCH₃-Signal der Estergruppe zusammenfällt.

V. Isolierungs- und Identifizierungsgang

Wir schlagen für einen Analysengang folgende Methode vor:

Die Isolierung des Rohextraktes richtet sich nach der Art der Bindung der Hydroxy-FS (siehe S. 15). Sind mehrere Arten in einem Untersuchungsmaterial vorhanden, so muß der Trennungsgang, wie unter IV. 2., S. 16 beschrieben, zur Anwendung kommen. Die freien FS werden anschließend entweder durch alkalische Verseifung, wobei der unverseifbare Anteil gut abgetrennt werden kann, oder durch saure Hydrolyse gewonnen. Sterine werden nach der letzten Methode zunächst mit Chloroform entfernt. Die saure Hydrolyse kann aber auch im Anschluß an die alkalische Verseifung erfolgen, wobei die Glykosidsäuren sich in der wässrigen Phase befinden. Die so erhaltenen freien Gesamt-FS prüft man DC auf Hydroxy-FS und mit dem früher beschriebenen Spezialreagenz speziell auf α -Hydroxy-FS. Sind α -Hydroxy-FS vorhanden, so kann eine Kupferchelatifällung zu ihrer Abtrennung durchgeführt werden. Da diese Methode nach unseren Erfahrungen nicht sehr zuverlässig ist, schlagen wir vor, auch die α -Hydroxy-FS wie die übrigen Hydroxy-FS weiter aufzuarbeiten.

Die Wahl der anschließenden Methylierungsmethode richtet sich nach der Substanzmenge. Dabei empfiehlt sich eine DC-Überprüfung auf Vollständigkeit der Umsetzung. Die Gesamt-FS-ME müssen auf Begleitstoffe, wie Sterine und Phenole geprüft werden. Dies geschieht am besten bei der DC Überprüfung. Dabei empfiehlt sich auch eine Acetylierung der Hydroxy-Gruppe.

Der nächste Schritt besteht in der Abtrennung der n-FS und Fraktionierung der Hydroxy-FS durch präparative Dickschichtchromatographie. Die n-FS werden getrennt weiterverarbeitet und gaschromatographisch untersucht. Dadurch können Hinweise auf Hydroxy-FS gewonnen werden. Von den Gesamt-Hydroxy-FS fertigt man zur Unterscheidung von den Fettalkoholen ein IR-Spektrum an. Alkaliisomerisierung und UV-Messung gibt

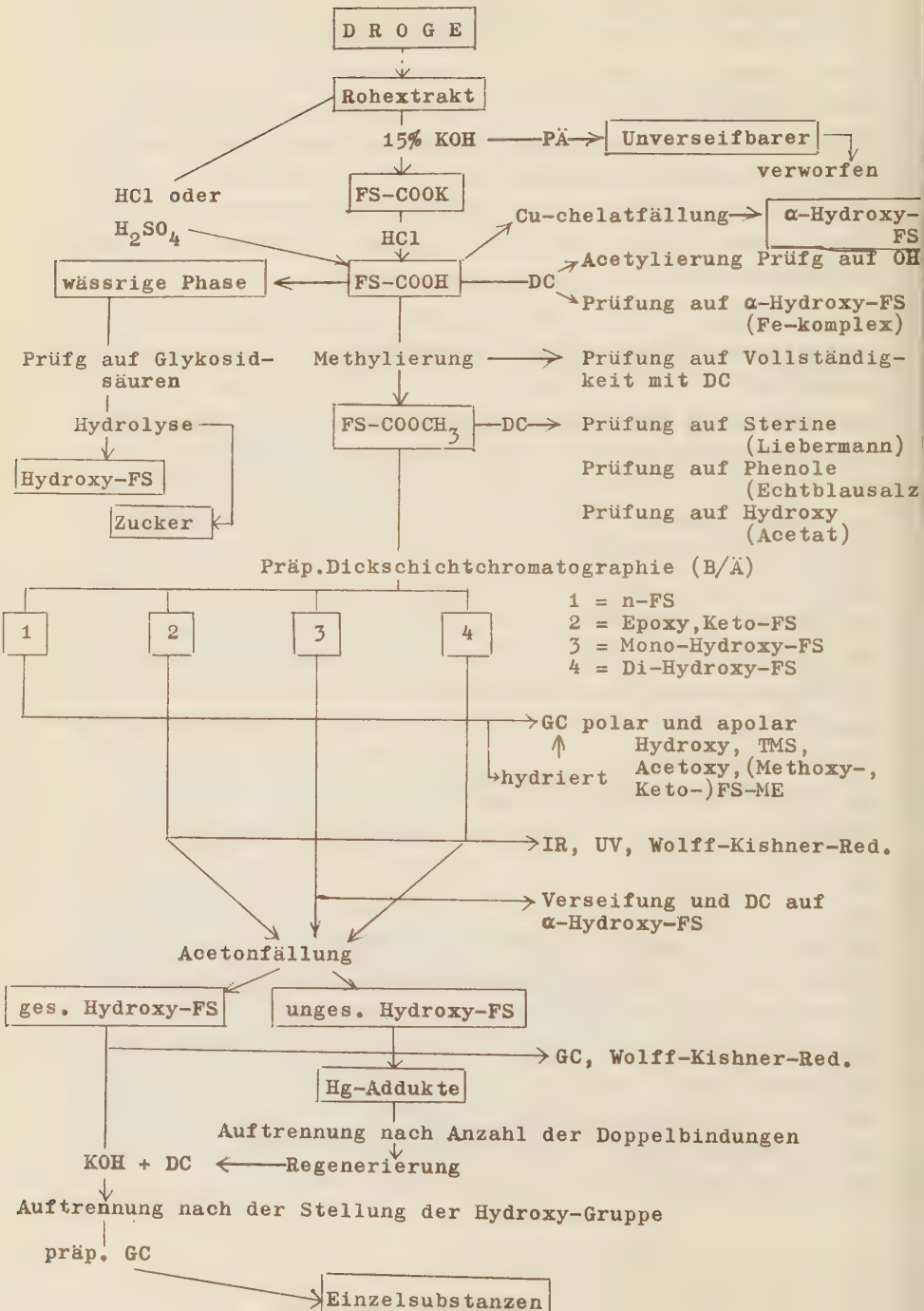
Hinweise auf das Vorliegen von konjugierten Hydroxy-FS und Acetylen-Hydroxy-FS. Die Struktur der Hydroxy-FS wird mit Hilfe der GC eingeengt, indem unbehandelte und hydrierte Substanzgemische verglichen werden. Die Anzahl der vorhandenen ungesättigten Verbindungen ist daraus ersichtlich. Weiterhin können Ergebnisse der DC der freien FS durch Vergleiche von Derivaten gaschromatographisch bestätigt und durch eine Wolff-Kishner-Reduktion die Kettenlängen im Gemisch festgelegt werden. Diese Ergebnisse bestimmen den Weg der Weiterverarbeitung.

Bei Anwesenheit von gesättigten und ungesättigten Hydroxy-FS führt man zu ihrer Trennung wiederholte Tiefkühlkristallisationen durch. Beide Fraktionen werden GC auf ihre Reinheit überprüft. Zur Abtrennung der restlichen gesättigten Säuren und zur Auftrennung nach Anzahl der Doppelbindungen, führt man die ungesättigte Hydroxy-FS in Quecksilberaddukte über. Nach deren Chromatographie und Regenerierung verseift man die ME mit 1.5 n Kalilauge 30 Minuten auf dem Dampfbad und führt eine präp. Dickschichtchromatographie der freien Säuren durch, um OH-Stellungsisomere aufzutrennen. Wenn nötig, schließt man eine präparative GC an, die zur Auftrennung der Homologen und zur Isolierung von Einzelsubstanzen führt. Die gesättigten Hydroxy-FS werden im Prinzip nach dem gleichen Schema behandelt (siehe Schema 2, S. 66).

Mit diesem Isolierungsgang können unter Wegfall einiger Fraktionierungen auch Keto- und Epoxysäuren isoliert werden.

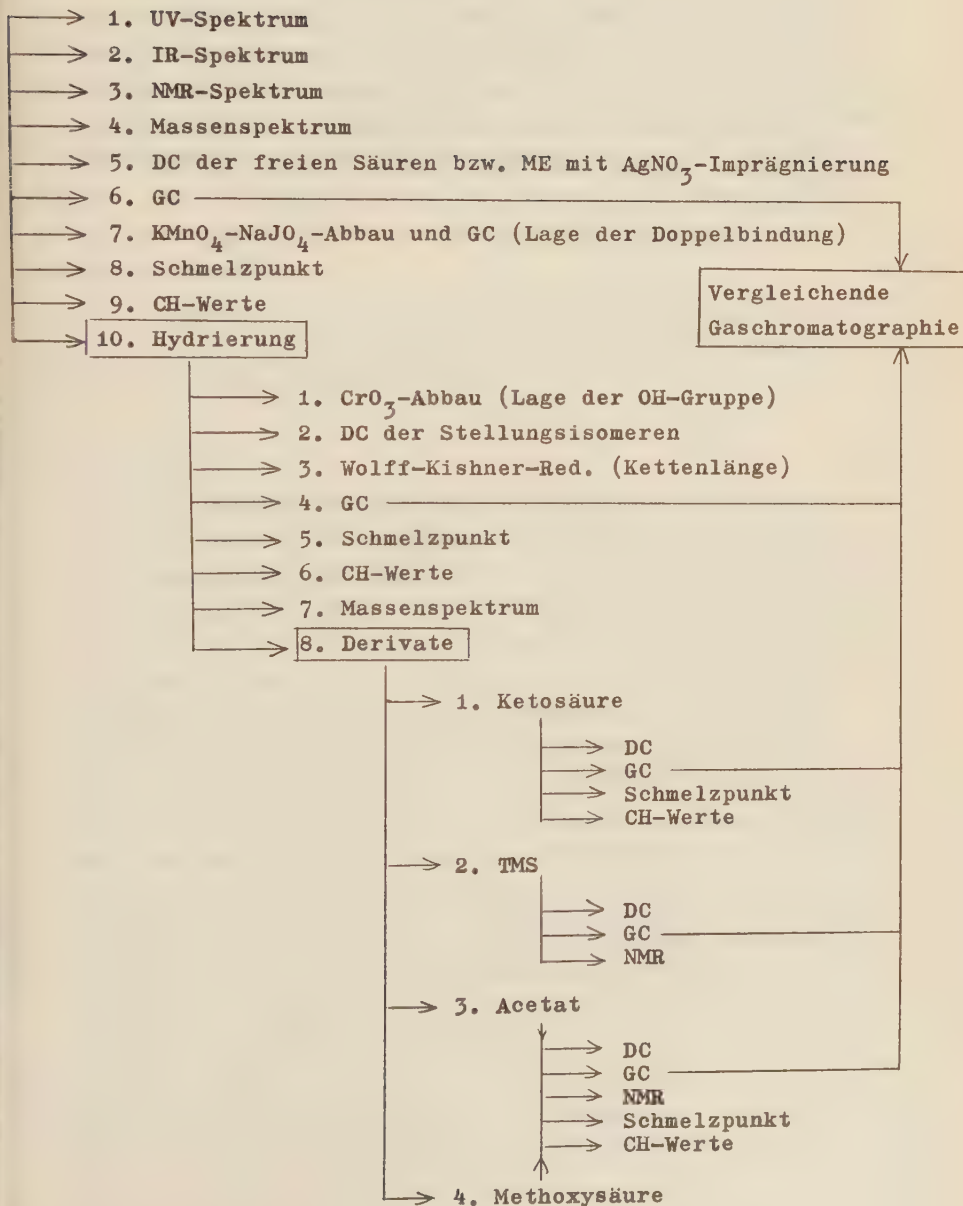
Zur vollständigen S t r u k t u r a u f k l ä r u n g der Einzelsubstanzen werden etwa 100 mg benötigt. Zuerst fertigt man UV-, IR-, NMR und Massen-Spektren an, wobei die eingesetzte Substanz mit Ausnahme der Massenspektroskopie, wieder zurückgewonnen werden können. Durch Vergleich mit Testsubstanzen und Derivaten ergänzt man die Ergebnisse durch DC der freien Säuren bzw. der ME auf Silbernitratimprägnierung und GC. Ein Permanganat-Perjodat-Abbau ergibt bei ungesättigten Säuren die Lage der Doppelbindungen, während am Ende CH-Werte und Schmelzpunkt bestimmt werden können.

Schema 2



Schema 3

Einzelsubstanzen



Nach erfolgter Hydrierung wird mittels des Chromsäure-Abbaues, unterstützt durch die DC Ergebnisse, die Lage der Hydroxy-Gruppe und durch eine Wolff-Kishner-Reduktion die Kettenlänge ermittelt. Schmelzpunkt, CH-Werte, Massenspektren und vergleichende GC ergeben weitere Informationen. Wenn nötig, können noch Derivate, wie Keto-, TMS-, Acetoxy- und Methoxysäuren, zur Strukturaufklärung herangezogen werden. Von diesen werden dann Schmelzpunkte, CH-Werte, DC, NMR-Spektren und vergleichende Gaschromatogramme angefertigt (siehe Schema 3, S. 67).

1. Untersuchung von 40 Drogen und Pflanzenextrakten auf das Vorkommen von Hydroxyfettsäuren

Bei der Suche nach geeignetem Untersuchungsmaterial kann nicht systematisch vorgegangen werden, da Hydroxy-FS für bestimmte Pflanzenfamilien oder -gruppen nicht charakteristisch sind. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich dadurch, daß das Auftreten von Hydroxy-FS offenbar auch jahreszeitlichen und vegetationsperiodischen Schwankungen unterworfen ist, d.h. von der Biosynthese der Pflanze abhängig ist. Hinzu kommt, daß sie in den meisten Pflanzenorganen nur in Spuren auftreten.

Die folgenden Ergebnisse wurden bei der Prüfung von Pflanzen aus der Klasse der Chlorophyceen, Phaeophyceen, Rhodophyceen und der Dicotyledonen erzielt.

1. Algenextrakte

Bei der dünnenschichtchromatographischen Untersuchung von 15 Grün-, Rot- und Braunalgen-Extrakten^{*)} konnten wir in 12 Arten Hydroxy-FS nachweisen. Trotz sorgfältigster zweijähriger Aufbewahrung unter Stickstoffatmosphäre und bei 0°, dürften diese Hydroxy-FS durch nachträgliche Oxydation entstanden sein, da bei der Aufarbeitung von frischen Pflanzen (*Prototheca* und *Sargassum linifolium*) keine Hydroxy-FS mehr zu finden waren. Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung, daß wir bei Linol- und Linolensäure-ME, die gleichen Bedingungen ausgesetzt waren, ebenfalls Hydroxy-FS nachweisen konnten.

Eine Ausnahme scheint die Braunalge *Dictiopteris polypodioides* darzustellen. Wie aus Abb. 36, S. 70, zu ersehen ist, waren in dem frisch verarbeiteten Algenmaterial neben Sterinen (R_f 0.25) und n-FS (R_f 0.85) auch Hydroxy-FS (R_f 0.4) nachweisbar.

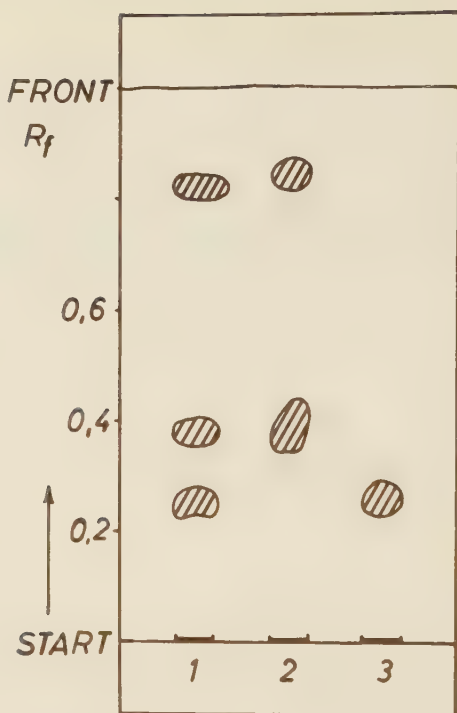


Abb. 36

Dünnschichtchromatogramm

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Benzin-Äther (7:3)

1 = Algengesamt-FS-ME

2 = Ricinus-FS-ME = $18=1\text{OH}^{12}$ (R_f 0.4) und
n-FS (R_f 0.85)

3 = Cholesterin

Nach Isolierung durch präparative Dickschichtchromatographie konnten wir durch die bei $2.95\ \mu$ auftretende OH-Bande im IR-Spektrum, sowie durch GC der TMS-Derivate das Vorliegen mehrerer Hydroxy-FS sichern. Nach dem GC Vergleich der hydrierten und nicht hydrierten Hydroxy-FS-Fraktion mußte es sich um drei ungesättigte Hydroxy-FS mit Kettenlängen zwischen C_{12} und C_{16} handeln. Eine Wolff-Kishner-Reduktion mit anschließender GC ergab dann als Hauptbestandteil eine C_{14} FS, neben wenig C_{15} und C_{16} FS (Abb. 37).

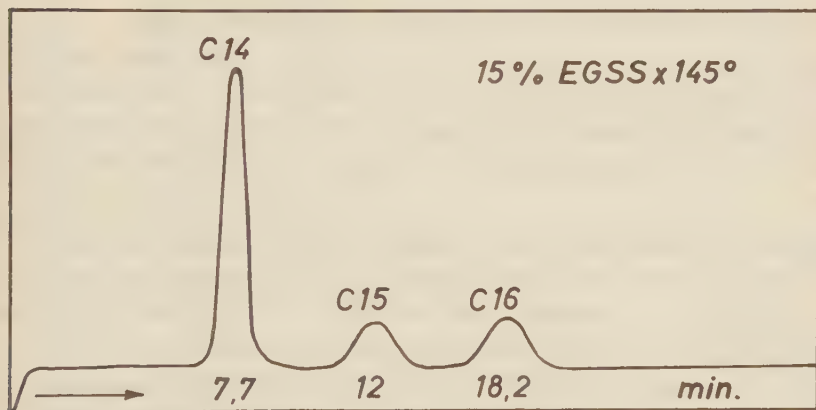


Abb. 37

Gaschromatogramm der hydrierten Algen-Hydroxy-FS-ME nach einer Wolff-Kishner-Reduktion auf einer 15% EGSSX-Säule bei 145°

Eine Trennung und exakte Strukturaufklärung der einzelnen FS konnte noch nicht erreicht werden, da eine zu einem späteren Zeitpunkt gesammelte zweite Algenprobe die erstmals nachgewiesenen Hydroxy-FS nur noch in Spuren enthielt.

2. Harzführende Drogen

Da Hydroxy-FS häufig als Bestandteil von Harzen gefunden wurden, konzentrierten wir uns auf pharmazeutisch verwendeten Harzdrogen und wählten davon folgende aus: Senna (Cassia-Arten), Haschisch (Cannabis sat. var. indica), Opium (Papaver somniferum), Schneeball (Viburnum opulus), Stinkasant (Asa foetida), Citrullus colocynthis und Zaunrübe (Bryonia dioica). Dabei lieferten nur die Früchte von Citrullus colocynthis ein positives Ergebnis.

Citrullus colocynthis (L.) Schrad. (Cucurbitaceae)

Durch V o r u n t e r s u c h u n g e n , die sich auf DC der freien FS und der ME, auf IR-Spektroskopie und vergleichende GC (wie unter IV. eingehend beschrieben) erstreckten, konnten wir eindeutig auf das Vorliegen von Hydroxy-FS schließen.

Zunächst gewannen wir durch erschöpfende Methanolextraktion des getrockneten Fruchtfleisches einen dunkelbraunen R o h - e x t r a k t . Dieser wurde dreimal mit kochendem Aceton behandelt und die eingedampfte Lösung weiterverarbeitet. Bei Nachisolierungen führten wir eine direkte Acetonextraktion durch, die aber niedrigere Ausbeuten lieferte. Nach alkalischer Hydrolyse mit 15% methanolischer Kalilauge trennten wir den Unverseifbaren mit Petroläther ab, der zum Teil aus gelben Farbstoffen bestand. Beim Ansäuern der dunkelbraunen Seifenlösung auf pH 2, wurden unter Bildung einer rotbraun gefärbten Lösung dunkelbraune harzartige Stoffe abgeschieden. Durch fünfmalige Petroläther-Ausschüttelung gewannen wir die Gesamt-FS, die noch mit gelben Farbstoff verunreinigt waren. Da eine Filtration der störenden Farbstoffe über Spezialkohlefilter zu keiner Abtrennung führte, wählten wir den Umweg über die ME. Bei der DC blieben die Farbstoffe weitgehend am Start zurück (Abb. 38, S.73). Um zu Verwechslung führende Substanzen auszuschließen, besprühten wir das D C d e r M E mit Liebermann-Reagenz (Sterine) mit Echtblausalz B (Phenole) und mit Triphenyltetrazoliumchlorid (Steroide mit vicinaler Hydroxy-

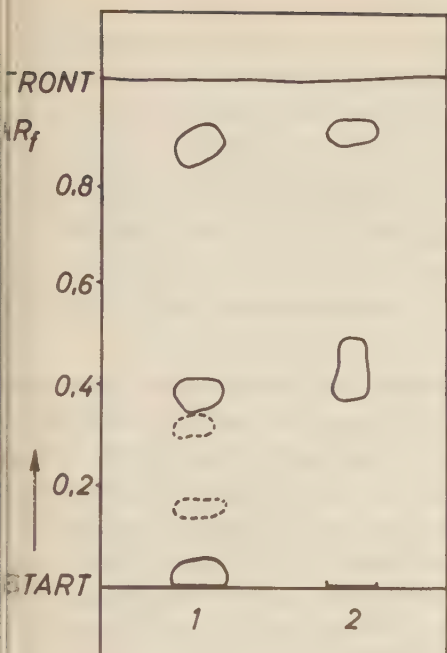


Abb. 38

Dünnschichtchromatogramm der
Methylester

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Benzin-Äther (7:3)

1 = Colocynthis-Gesamt-FS-ME

2 = Ricinus-FS-ME =

$18=1\text{OH}^{12}$ (R_f 0.4)

und n-FS (R_f 0.9)

Abb. 39

Dünnschichtchromatogramm der
freien FS

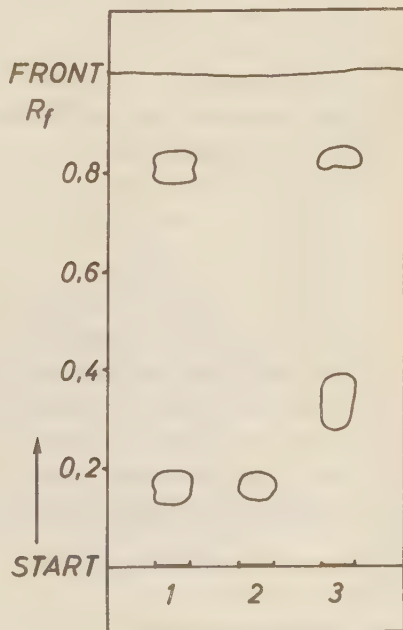
Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform-Äthyl-
acetat-Ameisensäure
(90:10:2)

1 = Colocynthis-Gesamt-FS

2 = $16=0\text{OH}^2$

3 = Ricinus-Gesamt-FS = $18=1\text{OH}^{12}$
(R_f 0.35) und n-FS (R_f 0.8)



und Keto-Gruppe: Elaterin⁸⁷⁾).

Sämtliche Substanzen waren abwesend, so daß neben n-FS (R_f 0.9) und Farbstoffen (R_f 0, 0.15, 0.35) mit Sicherheit Mono-Hydroxy-FS (R_f 0.4) vorhanden sein mußten (Abb. 38, S.73).

Das D C a u f f r e i e F S (Abb. 39, S.73) ließ anhand eines R_f -Vergleichs mit Testsubstanzen α -Hydroxy-FS vermuten. Durch anschließendes Besprühen mit Eisen(II)chlorid-Ammonrhodanid-Lösung konnten wir schließlich α -Hydroxy-FS eindeutig nachweisen, was durch GC Untersuchungen (Abb. 41 II, S. best. bestätigt wurde.

Da α -Hydroxy-FS nach unseren bisherigen Kenntnissen vorwiegend aus Sphingo- und Glykolipiden stammen, führten wir noch Parallel-Versuche mit Benzol- und Methanolextrakten durch. Dabei stellten wir fest, daß mit beiden Extraktionsmitteln annähernd dieselben Ausbeuten erhalten wurden (siehe Tabelle 10 im Experimentellen Teil, S.108). Der Benzolmethode ist deshalb der Vorzug zu geben, da mit ihr wesentlich weniger Begleitstoffe mitextrahiert werden, so daß die Weiterverarbeitung wesentlich erleichtert wird.

Nach anschließender präparativer D i c k s c h i c h t - c h r o m a t o g r a p h i e untersuchten wir zuerst die n-FS-Fraktion:

Das Säuregemisch wurde zweimal über Platten gereinigt, ein Teil hydriert und gaschromatographisch untersucht. Dabei erhielten wir Kettenlängen von C_{12} bis C_{26} . Neben den gesättigten traten noch folgende ungesättigte FS auf: $15=1$, $16=1$, $18=1$, $18=2$, $18=3$.

Da aber das Fruchtfleisch stark mit Samen durchsetzt und deren Beseitigung unmöglich war, verlasen wir einige Samen mit der Hand und untersuchten sie auf ihre FS-Zusammensetzung. Dabei waren keine Hydroxy-FS, aber n-FS von C_{12} bis C_{18} mit oben genannten ungesättigten FS vorhanden (Abb. 40 a), S.75). Damit war bewiesen, daß die Hydroxy-FS nur aus dem Fruchtfleisch und nicht aus den Samen stammen.

Zur Ermittlung der n-FS-Zusammensetzung der Sphingolipide verseiften wir den Benzolextrakt mit Kalilauge in der Kälte, säuerten an, schüttelten die freien Triglycerid- und Phosphatid-FS aus und hydrolysierten die in der Unterphase verbliebenen Cerebrosid-FS durch mehrstündiges Erhitzen mit 6n-HCl. Die gaschromatographische Analyse ergab gesättigte n-FS von C_{12} bis C_{26} (Abb. 40 b).

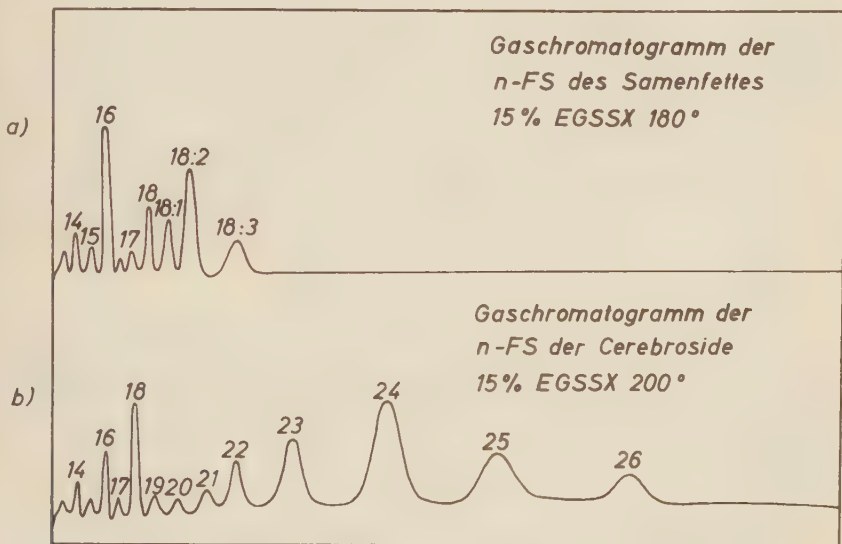


Abb. 40

Gaschromatogramme mit einer 15% EGSSX-Säule

a) = n-FS des Samenfettes

b) = n-FS der Cerebroside

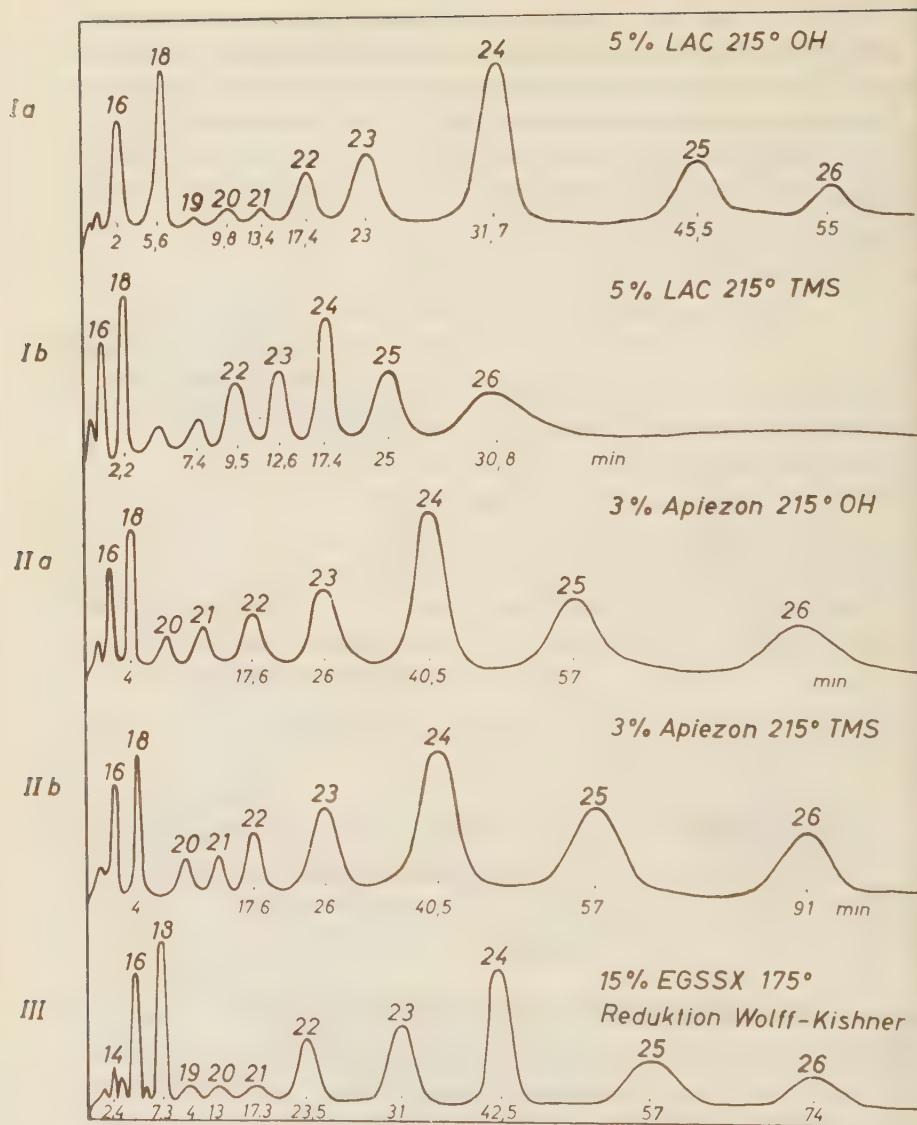


Abb. 41

Gaschromatogramme der α -Hydroxy-FS-NE aus *Citrullus colocynthis*
 ($C_{14} - C_{26}$)

I = auf einer 5% LAC-Säule bei 215°
 II = auf einer 3% Apiezon-Säule bei 215°
 III = nach einer Wolff-Kishner-Reduktion auf einer 15% EGSSX-Säule bei 175°

a = unbehandelt
 b = silyliert

Hydroxy-FS-Fraktion:

Wie die n-FS reinigten wir die Hydroxy-FS-Fraktion mittels einer zweiten präparativen Dickschichtchromatographie mit Benzin-Äther (1:1) als Laufmittel, ohne jedoch den gelben Farbstoff völlig abtrennen zu können. Da wir auch ungesättigte Hydroxy-FS vermuteten, führten wir eine mehrmalige T i e f k ü h l k r i - s t a l l i s a t i o n durch. Dabei wurden die gesättigten α -Hydroxy-FS in Form eines weißen Niederschlages erhalten, während der Überstand, der die Fraktion der ungesättigten FS enthielt, stark gelb gefärbt war. Bei näherer Untersuchung waren darin keine Hydroxy-FS mehr enthalten. Mit 10 mg Substanz ermittelten wir die Kettenlänge der α -Hydroxy-FS durch eine W o l f f - K i s h n e r - R e d u k t i o n . Wie aus Abb. 41 III, S.76, ersichtlich ist, handelt es sich um Kettenlängen von C₁₂ bis C₂₆, wobei C₁₆, C₁₈ und C₂₂ - C₂₆ den Hauptbestandteil bilden (Tab. 5).

T a b e l l e 5

Hydroxy-C	12	(13)	14	(15)	16	(17)	18	(19)	20	21	22	23	
Anteil	0.45	0.1	0.65	0.1	5.9	0.1	11.5	0.1	1.0	1.3	7.8	9.1	
										24	25	26	
										42.0	13.6	6.5	

Durch v e r g l e i c h e n d e G a s c h r o m a t o g r a - p h i e mit Hydroxy-FS über ihre TMS-, Acetoxy-, hydrierten Derivate auf polaren und apolaren Säulen (Abb. 41, S. 76) wurden unsere bisherigen Ergebnisse (DC) bestätigt. Vor allem brachte der Vergleich des Hydroxy-FS-Gemisches mit silyliertem Gemisch auf der apolaren Apiezonssäule den Beweis, daß alle Substanzen α -Hydroxy-FS sind, da bei keiner FS eine Verschiebung des TMS-Peaks auftrat (Abb. 41 II a + b).

Einen weiteren Beweis führten wir durch Zumischung von authentischen α -Hydroxy-FS zur Analysenprobe. Dabei wurden im GC die Peakflächen erhöht. Zusätzliche Peaks traten nicht auf.

I n f r a r o t - (Abb. 42) und K e r n r e s o n a n z - s p e k t r o s k o p i e (Abb. 43 u. Abb. 44, S.79) bestätigten unsere Ergebnisse. Wir stellten hierzu Überlagerungsspektren mit α -Hydroxy-FS-ME aus Gehirncerebrosiden her, die sich vollständig glichen.

Wie Abb. 42 zeigt, ist die Hydroxy-Bande bei 2.95μ gut ausgeprägt, während die verhältnismäßig schwachen Esterbande zwischen 7.8 und 8.5μ und die stärker ausgeprägte CH_2 -Bande bei 13.9μ darauf hinweisen, daß lange FS-Ketten vorliegen.

Die NMR-Spektren (Abb. 43 und 44) stimmen nicht nur in der Lage der vier Signale bei 0.9 , 1.3 , 2.6 und 3.8 ppm überein, ihre Integration gibt auch die gleiche Protonenzahl. Dieser Befund erlaubt den Schluß, daß die Kettenlängen beider Säuremischungen annähernd gleich sind. Weiterhin ist aus dem Protonenverhältnis der Hydroxy-Gruppe zu CH_2 -Gruppen ersichtlich, daß die Ketten eine höhere C-Zahl als C_{20} haben müssen.

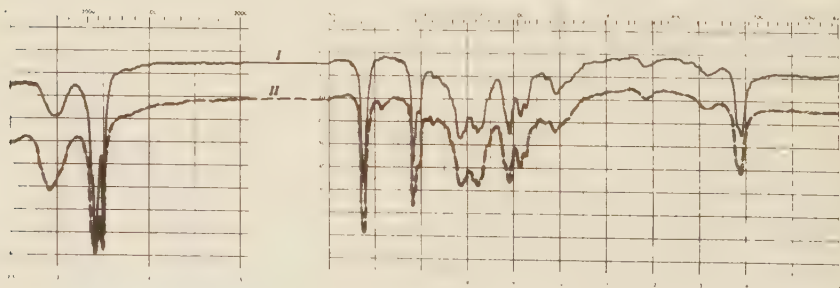


Abb. 42

IR-Überlagerungsspektrum von

I = Hydroxy-FS-ME aus *Citrullus colocynthis*

II = authentische Hydroxy-FS-ME aus Gehirncerebrosid

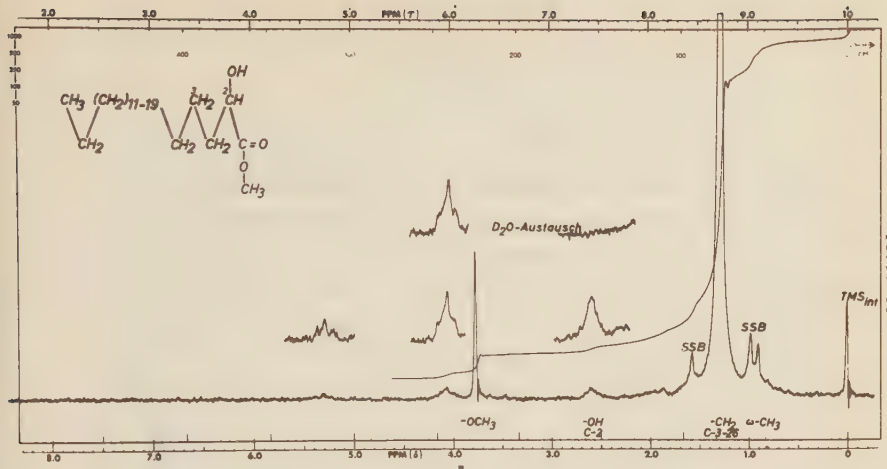


Abb. 43

NMR-Spektrum authentischer α -Hydroxy-FS-ME aus Gehirncerebrosid

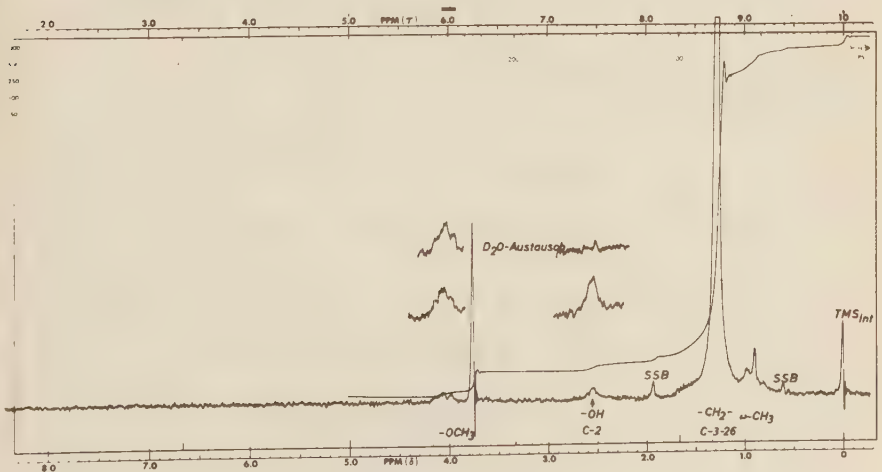


Abb. 44

NMR-Spektrum der Hydroxy-FS-ME aus Citrullus colocynthis
SSB = Spinseitenbande

Da die Struktur der Hydroxy-FS durch die oben genannten Nachweise völlig geklärt war, entfiel die Isolierung der Einzelsubstanzen. Zur Untersuchung des Basenanteils verseiften wir den Rohextrakt 24 Stdn. bei 37° und beseitigten die hydrolisierten Neutralfette. Die in der Zwischenphase angereicherten Sphingolipide reinigten wir durch Säulenchromatographie (Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4) über Kieselgel. Nach DC Vergleich mit Testsubstanzen handelt es sich wahrscheinlich um Cerebroside. Durch saure Hydrolyse spalteten wir dann die Säureamidbindung, entfernten die Sphingosinsäuren (α -Hydroxy-FS und n-FS) und alkalisierten mit Kalilauge. Durch Ätherextraktion gewannen wir die freien Basen. Zweidimensionale DC (Abb. 45, S.81) ergab als Basenanteile Sphingosin und Dihydrosphingosin, die aber zum endgültigen Beweis in größerer Menge isoliert und GC als Silyläther und spektroskopisch untersucht werden müßten. Ebenso steht die Untersuchung des Zuckeranteils noch aus.

Die FS- und Basen-Zusammensetzung ist demnach folgende:

- 1) n-FS: C_{12} bis C_{26}
- 2) α -Hydroxy-FS: C_{12} bis C_{26}
- 3) Basen: vermutlich Phyto-, Dihydro- und Anhydrosphingosin.

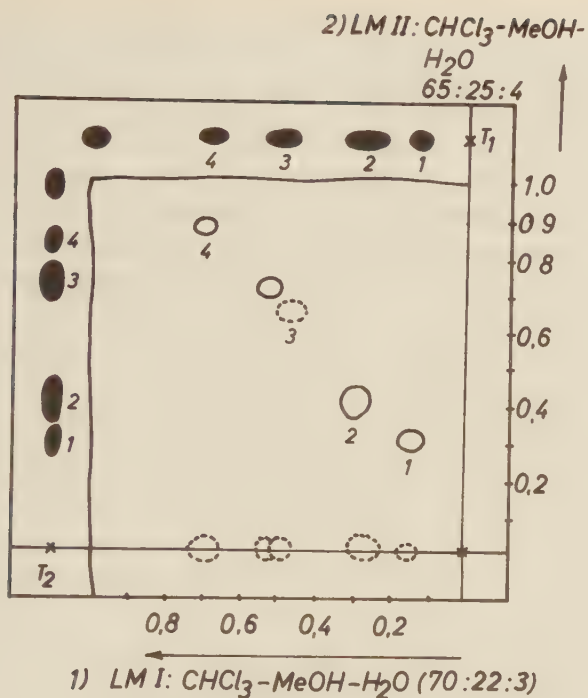


Abb. 45

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Sphingosinbasen

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel I: Chloroform-Methanol-Wasser (70:22:3)

II: Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)

S = Substanzgemisch

T = Testgemisch

1 = Phytosphingosin

2 = Dihydrosphingosin

3 = Anhydrosphingosin

4 = Phytosphingosinderivat

3. Pinus spec. (Coniferae)

Auffallend ist das Vorkommen von Phytoglykolipiden in fett- und stärkereichen Samen, wie in Soja, Erdnuß, Sonnenblumenkernen, Flachs, Baumwollsaat, Mais und Weizen¹¹⁴⁾. Deshalb vermuteten wir auch in Pinienkernen diese Stoffgruppe.

Wir führten Extraktionsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen mit Samen durch, aus denen bereits Phytoglykolipide isoliert wurden. Hierzu verwendeten wir pulverisierte Sojabohnen und Erdnußkerne¹¹⁴⁾. Bei den in der Literatur angegebenen Arbeiten¹¹⁴⁾ diente aber als Ausgangsmaterial nicht die Droge, sondern bereits ein industriell gewonnener Phosphatidextrakt. Nur ZOFCSIK⁶³⁾ gibt ein Verfahren zur direkten Extraktion aus der Droge an, das aber einen großen Zeitaufwand erfordert, da nacheinander Chloroform, Methanol, Wasser und deren Mischungen verwendet werden müssen.

Wir entfetteten zuerst die pulverisierten Samen mit kaltem Chloroform durch dreimaliges Homogenisieren. Um sicher zu sein, daß keine Phytoglykolipide mitextrahiert wurden, untersuchten wir den so gewonnenen Fettextrakt papierchromatographisch. Dabei konnten wir nur Neutralfette und geringere Mengen an Lecithin und Kephalin nachweisen.

Mit der so vorbehandelten Droge führten wir mit folgenden Lösungsmitteln eine dreimalige Extraktion auf dem Dampfbad durch: Benzol, Benzin, Chloroform, Chloroform-Methanol (2:1), Benzol-Benzin-Methanol (1:1:1), Methanol, Methanol-Wasser (95:5). Die so gewonnenen Rohextrakte wurden papierchromatographisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß Phytoglykolipide im Gegensatz zu Sphingolipiden mit den apolaren Lösungsmitteln Benzol, Benzin, Chloroform, auch bei Zusatz einer polaren Komponente, wie in Chloroform-Methanol (2:1) und Benzol-Benzin-Methanol (1:1:1), nicht extrahierbar sind. Jedoch im Methanolextrakt konnten wir Phytoglykolipide nachweisen und bei Verwendung der Methanol-Wasser-Mischung erhielten wir neben PS, MPI und Lyso-MPI einen hohen Anteil an Phytoglyko-

lipiden. Die Ausbeuten konnten wir nochmals durch Extraktion im Autoklaven erhöhen.

Eine weitere Anreicherung der Phytoglykolipide erzielten wir durch Behandlung des oben gewonnenen Methanol-Wasser-Extraktes mit 10% Kalilauge bei 37° über 24 Stdn.. Dabei werden die Esterphosphatide gespalten, während die Phytoglykolipide intakt bleiben. Die Phosphatidsäuren werden durch Petroläther-Ausschüttelung beseitigt, die in der Unterphase verbliebenen Phytoglykolipide mit 6 n Salzsäure angesäuert und 6 Stdn. auf dem Dampfbad erhitzt. Durch anschließende Petrolätherextraktion erhielten wir die Phytoglykolipid-Gesamt-FS, während in der Unterphase die Basen und Zucker zurückbleiben.

Die Säurefraktion chromatographierten wir auf DC-Platten und wiesen selektiv α -Hydroxy-FS nach. Nach anschließender Methylierung isolierten wir die n-FS und α -Hydroxy-FS mittels präparativer Dickschichtchromatographie und untersuchten sie gaschromatographisch. Dabei chromatographierten wir auf polaren und apolaren Säulen wie unter *Citrullus colocynthis* beschrieben.

Mit diesem einfachen Isolierungsgang gelang es uns, in Pinienkernen, sowie in den zur Kontrolle durchgeführten Parallelversuchen mit Sojabohnen und Erdnußkernen, Phytoglykolipide nachzuweisen und daraus α -Hydroxy-FS zu isolieren und ihre Zusammensetzung aufzuklären.

Wie aus Abb. 46, S. 84, und Tab. 6 ersichtlich ist, bestehen die α -Hydroxy-FS aus Pinienkernphytoglykolipid vorwiegend aus C₁₄, C₁₆, C₁₈, C₂₀ - C₂₄-Ketten. Die IR- und NMR-Überlagerungsspektren mit authentischen α -Hydroxy-FS decken sich praktisch mit den obigen Befunden (siehe unter *Citrullus colocynthis*).

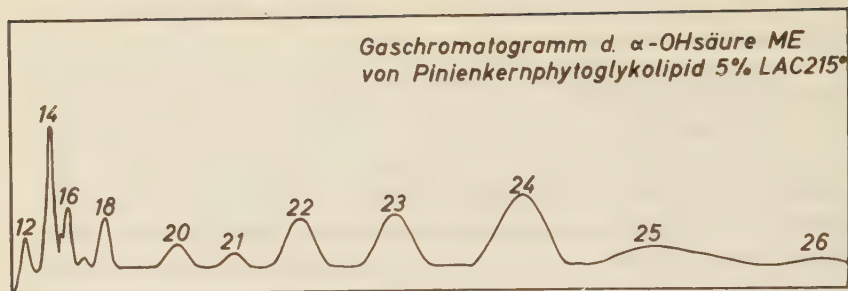


Abb. 46

Gaschromatogramm der α -Hydroxy-FS-ME

T a b e l l e 6

Kettenlänge	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
% Anteil	0.5	9.7	0.1	6.4	1.5	8.7	-	7.5	3.1	8.75	14.6	33.0	0.5	0.1

4. Samenöle

Wie in den unter 1. genannten Algen waren auch in FS-Extrakten von gelagerten Samenölen Hydroxy-FS nachweisbar. Bei den untersuchten Extrakten handelte es sich um Labiaten, Boraginaceen und Scrophulariaceen.

Da aber Frischextrakte aus den Samen von *Carduus marianae* (Labiales), *Euphorbia lathyris* (Euphorbiaceae), *Citrullus colocynthis*, *Cucurbita pepo*, *Curcuma sativa* und *melo* (Cucurbitaceae) neben Sterinen keine Hydroxy-FS enthielten, dürften auch hier die nachgewiesenen Hydroxy-FS nachträglich bei der Lagerung durch Autoxydation entstanden sein.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Isolierung

1. Darstellung der Rohextrakte

100 g Droge wurden in einem Multimix grob zerkleinert und anschließend mit dem entsprechenden Lösungsmittel 10 Min. mit einem Servall-Homogenisator homogenisiert. Durch diese Vorbehandlung war eine optimale Extraktion gewährleistet. Bei der Untersuchung von glyceridhaltigen Samen verwendeten wir nur den zehnten Teil der Ausgangsmenge.

War in der Droge Chlorophyll enthalten, so gewannen wir die G l y c e r i d e durch erschöpfende Petroläther-Extraktion im Soxhlet. Bei Chlorophyll-freier Droge konnte die schnellere Kaltextraktion mit Chloroform durchgeführt werden. Dabei wurde das Drogengut dreimal mit 300 ml Chloroform homogenisiert, abgepreßt und der flüssige Extrakt im Vakuum bei 40° eingedampft.

P h o s p h a t i d e extrahierten wir auf dem Dampfbad. Dabei wurden 100 g Droge mit einem Liter einer Mischung aus Chloroform-Methanol (2:1) vier Std. unter Rückfluß gekocht und nach dem Erkalten die Droge abgepreßt. Dieser Arbeitsgang wurde noch dreimal wiederholt und die vereinigten flüssigen Extrakte im Vakuum bei 40° von Lösungsmittel befreit.

Nach Entfettung der Droge mit kaltem Chloroform im Homogenisator (siehe unter Glyceride) ließen sich S p h i n - g o l i p i d e und G l y k o s i d h a r z e durch dreimalige Extraktion mit je 1 l Methanol gewinnen. Dabei mußte jeweils 4 Std. auf dem Dampfbad erhitzt werden.

Die P h y t o g l y k o l i p i d e wurden nach vorangegangener Entfettung des Drogengutes (siehe oben) mit einer

Methanol-Wasser-Mischung (95:5) extrahiert. Dabei wurden 100 g vorbehandelte Droge viermal 5 Stdn. mit jeweils frischen Lösungsmittel behandelt und der flüssige Extrakt anschließend im Vakuum eingedampft. Bei Aufarbeitung größerer Mengen führten wir die Extraktion im Autoklaven bei 80° und 1 bis 2 atü durch.

2. Hydrolyse

Die quantitative Spaltung von 10 g Rohextrakt führten wir wie folgt durch:

Glyceride und Esterphosphatide:

50 ml 15% methanolische Kalilauge über 24 Stdn.
bei 35 - 40° am Rückfluß
oder eine Stde. auf dem Dampfbad unter Zusatz
von 5% Ascorbinsäure als Oxydationsschutz.

Sphingolipide:

50 ml 15% methanolische Kalilauge bei 100° über
2 Stdn.
oder saure Hydrolyse (siehe im folgenden)

Phytoglykolipide und Glykosidharze:

50 ml einer Mischung aus 20% Schwefelsäure und
Äthanol (1:1⁶⁴) unter Rückfluß über 3 Stdn.
oder meth. HCl (5%) über 6 Stdn. zur direkten Darstellung der Methylester.

Die alkalische Seifenlösung wurde anschließend mit der doppelten Menge Wasser verdünnt, der Unverseifbare mit 3 x 100 ml Petroläther entfernt und unter Kühlung mit Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die freien Säuren gewannen wir durch dreibis fünfmaliges Ausschütteln mit 10 ml Petroläther. Ist in der Unterphase kein Alkohol enthalten, muß dem Petroläther etwas peroxidfreier Äther zugesetzt werden.

3. Darstellung der Methylester

Mikromengen bis zu 1 g stellten wir nach der vereinfachten **D i a z o m e t h a n m e t h o d e** ⁶⁵⁾ dar.

Die freien FS wurden in Äther-Methanol (27:3) gelöst und in diese Lösung mit gereinigtem Stickstoff als Trägergas, Diazomethan solange eingeleitet, bis die Lösung gelb gefärbt war. Diazomethan wird dabei aus einer Lösung von MNSA (n-Methyl n-nitrosyl-p-toluylsulfonamid) in Äther mittels Kalilauge entwickelt. Genaue Beschreibung der Versuchsanordnung siehe Dissertation POHL ⁶⁵⁾.

Die Methylierung im präparativen Maßstab erfolgte im Wesentlichen nach der **B o r t r i f l u o r i d - M e t h o d e** nach MORRISON und SMITH ⁶⁷⁾.

Reagenz:

1 l wasserfreies Methanol (durch Al_2O_3 -bas.-Filtration) wurde in einer 2 l-Flasche abgewogen und in ein Eisbad gebracht. Aus einer Vorratsbombe leiteten wir mit Hilfe eines Glasrohres solange Bortrifluorid ein, bis das Methanol 140 g aufgenommen hatte (Abzug). Dabei soll das Gas vor Einbringen und nach dem Herausnehmen des Einleitungsrohres strömen, um ein Eintreten der Lösung in die Bombe zu vermeiden. Die methanolische Lösung ist mehrere Monate haltbar.

Durchführung:

1 g Fettsäuren werden in einem 500 ml Schütteltrichter in 20 ml methanolischer BF_3 -Lösung aufgenommen und die Lösung 15 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend hydrolisierten wir mit 150 ml Wasser und schüttelten zweimal mit 30 ml CHCl_3 kräftig durch. Nach der Trennung der Phasen wurde die CHCl_3 -Schicht abgelassen und mit Wasser säurefrei gewaschen, über Na_2SO_4 sicc. getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 35° abgedampft.

II. Chromatographische Untersuchungen

1. Dünnschichtchromatographie der Gesamtsäuren

a) Herstellung der Fluoreszenzplatten

Wir verwendeten Glasplatten der Dimension 12 x 20 cm. 16 g Kieselgel G (Merck) wurden mit einer Lösung von 5 mg Pyranin (=3-Hydroxy-Pyren 5,8,10-trisulfonsaures Natrium) in 32 ml Wasser angerieben. Diese Suspension wurde mit einem Streichgerät für Dünnschichtplatten gleichmäßig in einer Schichtdicke von etwa 250 μ auf vier Platten aufgetragen. Anschließend wurden die Platten eine Stunde bei 120⁰ im Trockenschrank aktiviert und im Vakuumexikator aufbewahrt.

b) Trennsysteme und Laufzeiten

Für freie Säuren: Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure
(90:10:2)

für Methylester: Benzin-Äthergemische
(7:3) zur Trennung der Gesamtsäuren
(1:1) zur Trennung der Mono- und
Ketosäuren von den Hydroxysäuren

Die Lösungsmittel wurden gemischt und zum Zwecke der Kammersättigung eine Stunde vor der ersten Chromatographie in die Kammer gegeben. Die Laufzeit beträgt bei einer Höhe von 15 cm für freie Säuren etwa 50 Min., für Methylester etwa 30 Min..

c) Nachweis der chromatographierten Säuren

Die Platten wurden nach der Chromatographie aus der Kammer genommen und nach Abdunsten der Hauptmenge des Lösungsmittels 10 Min. im Trockenschrank bei 70⁰ belassen. Anschließend betrachteten wir das Chromatogramm unter dem UV-Licht (366 m μ). Dabei fluorescieren die Fettsäuren mit einer hellblauen Farbe auf grünlich

gelbem Untergrund. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 γ .

Ungesättigte Fettsäuren wiesen wir durch Einstellen der Platte in eine Osmiumtetroxyd-Kammer nach. Diese werden dabei schwarz angefärbt. Auf freie α -Hydroxy-FS besprühten wir nacheinander mit gesättigten wässrigen Lösungen von Eisen(II)sulfat und Ammoniumrhodanid. Im Gegensatz zu allen anderen Hydroxy-FS färben sich die α -Hydroxy-FS dabei zitronengelb an, während die restlichen Säuren unsichtbar bleiben. Bei längerem Liegen an der Luft werden die Flecke überdeckt, da sich die ganze Platte, infolge Luftoxydation, braunrot verfärbt.

Die Prüfung auf Begleitstoffe erfolgte mit Liebermann-Burchard-Reagenz⁶⁸⁾. 5 ml Essigsäureanhydrid, 5 ml konz. Schwefelsäure und 50 ml Äthanol p.a. werden unter Eiskühlung gemischt. Die damit besprühten Platten gibt man 10 Min. bei 105° in den Trockenschrank.

Sterine färben sich blauviolett an, während ungesättigte FS eine bräunliche Farbe annehmen.

Mit frisch bereiteter 0.5% wässrigen Echtblausalz B-Lösung besprühten wir zum Nachweis eventuell vorhandener Pheno-
nole, die bei Nachbehandlung mit 1/10 n Natronlauge eine dunkelblaue bzw. rötliche Farbe ergeben.

a) Tabelle der R_f -Werte

Freie Säuren:	Substanz	R_f -Wert
	n-FS	0.75-0.85
	Epoxy-, Keto-FS	0.65
	Mono-Hydroxy-FS	0.20-0.55
	Di-Hydroxy-FS	0.15-0.25

Methylester:	Substanz	15%	30%	50% Äther- zusatz
	n-FS	0.8	0.93	0.98
	Epoxy-, Keto-FS	0.55	0.75	-
	Dicarbonsäure	0.4	0.6	-
	Mono-Hydroxy-FS			
	Alkohole	0.2	0.45	0.7
	Di-Hydroxy-FS			
	Acetoxy-FS			
	TMS	0.35	0.8	0.92
	Methoxy-FS	0.43	0.85	0.96

R_f -Verschiebung der freien Mono-Hydroxy-FS nach Acetylierung
am Beispiel von C_{18} Isomeren:

Stellung der Hydroxy-Gruppe in der FS-Kette	OH	Acetat
C_{12}	0.42 $\longrightarrow$	0.75
C_9	0.35 $\longrightarrow$	0.65
C_2	0.25 $\longrightarrow$	0.50
C_{18}	0.20 $\longrightarrow$	0.40

2. Dünnschichtchromatographie der Quecksilber-II-acetat- Addukte

Die Chromatographie der Addukte erfolgte nach der von POHL⁶⁵⁾
angegebenen Methode.

Adsorbens: Kieselgel G (Merck) - Kieselgur G (Merck) (3:7)

Schichtdicke: 250 μ

Aktivierung: 90 Min. bei 55°

Trennsystem: Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100:0.5:15.7)
Kammersättigung

Laufhöhe: 16.5 cm

Laufzeit: 5 Stdn.

Sichtbarmachung: Nach Vortrocknen im kalten Luftstrom feuchte
Platten mit 0.1% isobutanol. Diphenylcarba-
zidlösung besprühen (blauviolette Zonen auf
rosa gefärbtem Untergrund).

3. Dünnschichtchromatographie der Homologen

Sie erfolgte mit Ausnahme des Adsorbens nach KAUFMANN und SUKO⁷³⁾.

Adsorbens: Kieselgel G - Kieselgur G (3:7)

Imprägnierung: Paraffin in Petroläther Sdp. = 30-40° (5:95)

Trennsystem: Eisessig-Wasser (9:1) mit Zusatz von 75% Imprägnierungsmittel. Unterphase zur Chromatographie.

Laufhöhe: 16 cm

Laufzeit: 3 Stdn.

Sichtbarmachen: Einstellen in Jodkammer

Übertragung auf Dickschichtchromatographie siehe unter 4.,
abweichend eine Kieselgel H - Kieselgurmischung mit 1 mm
Schichtdicke.

4. Präparative Dickschichtchromatographie

Plattengröße: 20 x 40 cm

Adsorbens: Kieselgel H (Merck), 80 g/Platte + 0.3% P₁

Schichtdicke: 2 mm

Auftragsmenge: 3 ml einer 15% Lösung in CHCl₃ (=450 mg Substanz)

Trennsystem: Benzin-Äther (7:3 bzw. 1:1)

Laufhöhe: 17 cm

Laufzeit: 45 Min.

Identifizierung: UV 360 mμ, hellblaufluorescierende Zonen.

Die Herstellung der Fluoreszenzplatten erfolgte wie unter 1. beschrieben mit dem Unterschied, daß wir die Dickschichtplatten 24 Stdn. an der Luft trocknen ließen, da bei sofortiger Aktivierung Risse entstehen, die die Trennung negativ beeinflussen. Nach erfolgter Trennung darf nicht, wie bei der Dünnschichtplatte, im Trockenschrank erhitzt werden. Man läßt das Lösungsmittel an der Luft verdunsten, um Veränderungen der Substanzen zu vermeiden. Nach Herauslösen der umrandeten Zonen verrührten wir das Kieselgel zuerst mit zehnfacher Menge kaltem Chloroform auf dem Magnetrührer. Wir wiederholten diesen Vorgang noch dreimal mit 30-40° warmen Chloroform, nutschten ab und dampften die Lösung im Vakuum ein.

Die so isolierten Fraktionen überprüften wir anschließend mittels DC und GC. Wenn nötig, führten wir eine zweite dickschichtchromatographische Auftrennung durch und veränderten den Ätheranteil des Laufmittels je nach Art der Verunreinigung.

5. Säulenchromatographie

Zur Trennung der freien Säuren und der Methylester verwendeten wir für 1 g FS-Gemisch 50 g Kieselgel (Merck) (0.05 - 0.2 mm Korngröße). Diese wurden mit 150 ml Laufmittel angeschlemmt und in die Säule eingefüllt. Dabei soll die Säulenhöhe von 50 cm nicht unterschritten werden. Der Querschnitt der Säule beträgt 2 cm. Vom Elutionsmittel wird soviel abgelassen, bis das Säulenmaterial gerade noch bedeckt ist und man errechnet dann das in der Säule verbliebene Lösungsmittel (hier 100 ml). Die konzentrierte Substanzlösung wird mit wenig Adsorbens vermischt auf die Säule gegeben. Dann wird eluiert und die ersten 100 ml (oben errechnet) verworfen. In den nächsten 30-50 ml befindet sich die Hauptmenge der n-FS. Anschließend werden Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen, eingedampft und chromatographiert. Bei der Säulenchromatographie der ME empfiehlt es sich nach Elution der n-FS den Äthergehalt des Laufmittels von 30% auf 60% zu erhöhen, um die Hydroxy-FS schneller aus der Säule herauszulösen. Bei der Chromatographie der freien Säuren muß anschließend die Ameisensäure entfernt werden. Die vereinigten Fraktionen werden dabei mehrmals mit Wasser säurefrei gewaschen, über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und eingedampft.

6. Gaschromatographie

a) für analytische Gaschromatographie verwendeten wir einen Gaschromatographen Modell Packard vom Typ 7500 mit einem β -Strahlen-argon-Ionisationsdetektor und Honeywell-Kompensationsschreiber vom Typ Elektronik 17. Hersteller: Packard Instrument Company, Inc. La Grange Illinois, USA.

Für präparative Gaschromatographie benützten wir einen Aerograph Autorep Mod.A 700 mit einem Hitzdraht-Detektor und einem Honeywell-Brown-Kompensationsschreiber vom Typ Elektronik. Hersteller: Wilkens Instrument u. Research Inc. California, USA.

Säulenmaterial:

- a) Spiralig gebogene Glassäulen von 4 mm innerem Durchmesser und 2 m bzw. 1 m Länge. Als Anschlüsse dienten Silikon-gummistopfen mit Teflonschläuchen
- b) Spiralig gebogene Aluminiumsäulen mit 9.6 mm Innendurchmesser und 2 m Länge.

Flüssige Phasen:

EGSSX (Äthylenglykol-Succinat) Applied Science Laboratories, Inc., State College, USA.

LAC-2R-446 (Diäthylenglykol-Succinat) Dr.Theodor Schuchardt, G.m.b.H., München

Apiezon L (Silikonfett) Dr.Theodor Schuchardt, G.m.b.H.,München

EGIP (Äthylenglykolisophtalat) Wilkens Instrument u. Research, Inc., California, USA.

Trägermaterialien:

Gaschrom P 100-120 mesh	Applied Science Laboratories, Inc., State College, USA, (Vertrieb für Deutschland: Serva, Heidelberg)
-------------------------	---

silanisieretes Kieselgur 0.1-0.2 mm	E.Merck A.G., Darmstadt
--	-------------------------

Chromosorb WS 45-60 mesh	Dr.Th.Schuchardt, G.m.b.H.,München
--------------------------	------------------------------------

Imprägnierung des Trägermaterials und Füllung der Säule:

Das Trägermaterial wurde zunächst mit stationärer Phase, die in Methylenchlorid gelöst war, zu einem Brei verrührt.

Darauf wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei schneller Umdrehung beseitigt. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurde das imprägnierte Trägermaterial in dünner Schicht 24 Stdn. im Vakuumtrockenschrank bei 100° er-

hitzt. In das Säulenende brachten wir einen Glaswollepfropfen, legten Vakuum an und füllten das imprägnierte Trägermaterial ein, ohne daß dabei Luftblasen entstehen konnten. Die gepackte Säule wurde zwei Tage unter Gasdurchfluß bei einer Temperatur, die 10% über der Betriebstemperatur der Säule lag, konditioniert.

a) analytische Gaschromatographie

Folgende S ä u l e n kamen zur Anwendung:

- (I) 15% EGSSX auf Gaschrom P 2 m
- (II) 5% LAC-2R-446 auf silanisiertem Kieselgur 2 m
- (III) 3% Apiezon auf Chromosorb WS 1 m

T r ä g e r g a s :

Spezialargon, Fa. Linde A.G., München

Folgende Daten hielten wir konstant:

Strömungsgeschwindigkeit: 60 bzw. 100 ml/Min.

Einspritzmenge: ca. 0.1 mg FS-ME in CHCl_3 p.a.
gelöst

Empfindlichkeit des

Detektors: 10^{-7} A

Schreibers: 3×10^{-8} bzw. 1×10^{-8} A

Papiervorschub: 5 Min./inch (5 mm/Min.)

Detektortemperatur: 215°

Einspritztemperatur: 235°

Auslaßtemperatur: 245°

Die S ä u l e n t e m p e r a t u r e n wurden wie folgt variiert:

Säule (I) $185 - 215^\circ$ für kurzkettige Hydroxy-FS,
Epoxy-, Ketosäuren

$145 - 185^\circ$ für Monocarbonsäuren

150° für Dicarbonsäuren

Säule (II) 215° für Hydroxy-FS-Gesamtanalysen
und langkettige α -Hydroxy-FS
(bis C_{26})

$190 - 215^\circ$ für Hydroxy-FS je nach Kettenlänge

Säule (III)	215°	für Hydroxy-FS-Gesamtanalysen
	200°	für kurzkettige Hydroxy-FS

b) präparative Gaschromatographie

Dazu verwendeten wir folgende Säulen :

(I)	20% LAC-2R-446 auf silanisiertem Kieselgur	2 m/1 cm
(II)	15% EGIP auf silanisiertem Kieselgur	1 m/1 cm

Trä g e r g a s :

Elektrolyt-Wasserstoff und nachgereinigter Stickstoff
(Gasofrakt) bzw. Spezial-Helium von der Fa.Linde A.G.,München

S t r ö m u n g s g e s c h w i n d i g k e i t : 200 ml/Min.

E i n s p r i t z m e n g e : 200 mg TMS-Äther in CHCl_3 p.a.
gelöst

P a p i e r v o r s c h u b : 5 Min./inch

	(I)	(II)
D e t e k t o r t e m p e r a t u r :	230°	250°
E i n s p r i t z t e m p e r a t u r :	213°	280°
C o l l e c t o r t e m p e r a t u r :	215°	260°
S ä u l e n t e m p e r a t u r :	215°	250°

(I) für kurzkettige Hydroxy-FS

(II) für langkettige Hydroxy-FS

Die F r a k t i o n e n wurden in Spezialgläsern mit Gummi-
stopfen, die mit gereinigter Glaswolle gefüllt und mit flüs-
siger Luft gekühlt waren, gesammelt.

III. Physikalische Untersuchungen

1. IR-Spektren

Die Infrarot-Spektren wurden mit einem Beckmann-Infrarotspektrometer IR 8 aufgenommen. Feste Proben (3-5 mg) wurden als KBr-Preßlinge, flüssige Proben als Film zwischen NaCl-Plättchen bestimmt.

2. UV-Spektren

Ultraviolett-Spektren wurden mit einem Zeiss Opton Spektrophotometer PM Q 2 in Methanol p.a. aufgenommen. Dabei wurden 1 - 2 mg Substanz in 100 ml Lösungsmittel gelöst und die Extinktion in Quarzküvetten bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

Zur Bestimmung der Doppelbindungen führten wir vorher eine Alkali-Isomerisierung mit Glykol-Kalilauge bei 180° durch und verglichen sie mit einer Blindprobe. (Genaue Ausführung siehe Dissertation POHL⁶⁵).

3. NMR-Spektren

Die Kernresonanzspektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre mit einem Varian A-60 A Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Als Lösungsmittel für 40 - 50 mg Substanz dienten 0.5 ml CDCl_3 bzw. CCl_4 p.a.

W. Darstellung der Derivate

1. Hydrierung

Hydrierungen wurden in einer Mikroanlage mit gereinigtem Wasserstoff durchgeführt. Als Lösungsmittel diente über Al_2O_3 -Säulen gereinigtes Tetrahydrofuran. Zur Hydrierung der Doppelbindung verwendeten wir einen Platinoxid⁷⁹⁾, zur partiellen Hydrierung der Dreifachbindung einen Palladium-Blei-Katalysator⁷⁴⁾.

Ausführung:

10 mg Substanz lösten wir in 1 ml Tetrahydrofuran unter Zugabe des entsprechenden Katalysators. Unter Rühren wurde solange Wasserstoff eingeleitet, bis nichts mehr verbraucht wurde. Dann dampften wir die Lösung im Vakuum ein, nahmen mit Benzin auf, filtrierten durch ein gehärtetes Filter und dampften erneut ein. Anschließend wurde aus Petroläther umkristallisiert.

2. Quecksilber-II-acetat-Addukte

Die Bildung erfolgte nach JANTZEN und ANDREAS⁸⁶⁾.

50 mg ungesättigte Hydroxy-FS-ME wurden in einer Mischung von 1.4 g Quecksilber(II)acetat, 25 ml Methanol, 0.25 ml Wasser und 0.1 ml Eisessig gelöst und 48 Stdn. im Dunkeln stehen gelassen. Dann entfernten wir das Lösungsmittel bei 30° im Vakuum, suspendierten den Rückstand in 10 ml Chloroform, wuschen fünfmal mit 5 ml Wasser und trockneten die Chloroformlösung über Na_2SO_4 sicc.

Die Regenerierung führten wir mit 6 ml Methanol und 0.8 ml 37% Salzsäure durch. Dabei ließen wir diese Mischung unter mehrmaligen Schütteln 1 Stde. im Dunkeln stehen, setzten 20 ml Wasser und 20 ml Petroläther zu und schüttelten gut durch. Nach Phasentrennung wurde die Oberphase dreimal mit 40 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und der Petroläther im Stickstoffstrom beseitigt.

3. Silylierung

Wir modifizierten die Methode von WOOD und Mitarb.⁷⁶⁾ wie folgt:

2 mg Hydroxy-FS-ME wurden im Schütteltrichter in 1 ml Pyridin gelöst, mit 0.2 ml Hexamethyldisilazan und 0.1 ml Trimethylchloresilan versetzt und eine halbe Minute geschüttelt. Dann ließen wir die Lösung 10 Minuten stehen, fügten dann Chloroform und soviel Wasser hinzu, bis beide Schichten klar waren. Wir schüttelten beide Phasen gut durch, trennten das Chloroform ab und wiederholten den Vorgang noch zweimal. Die vereinigten Chloroform-Ausschüttelungen wuschen wir dreimal mit Wasser und trockneten sie über Na_2SO_4 sicc. Die Verunreinigung durch Pyridin beseitigten wir durch DC auf Kieselgel (Benzin-Äther 1:1), wobei dieses am Startpunkt zurückbleibt.

Die Regenerierung nahmen wir mit methanolischer Salzsäure auf dem Dampfbad vor.

4. Acetylierung

Die Umsetzung erfolgte nach FRITZ und SCHENK⁷⁷⁾ in leicht modifizierter Form:

2 - 20 mg Hydroxy-FS wurden mit 2 ml frisch bereitetem Acetylierungsreagenz versetzt und im siedenden Wasserbad 5 Min. lang mittels Magnetrührer gerührt. Sodann verdünnten wir mit gleichem Volumen Wasser und schüttelten die Acetate mit Petroläther aus. Die vereinigten Petrolätherextrakte wuschen wir mit Wasser säurefrei, trockneten über Na_2SO_4 sicc. und trennten das Pyridin mittels DC ab (Benzin-Äther 1:1).

Acetylierungsreagenz:

Auf einem Magnetrührer wurden 7.5 ml Pyridin und 2.5 ml Essigsäureanhydrid gemischt und darin 100 mg p-Toluolsulfonsäure gelöst.

Nach dem Verfahren von STETZER und SMULLIN⁷⁸⁾ verwendeten wir für 10 mg Hydroxy-FS 5 ml Reagenz, das sich aus 1.44 g p-Toluolsulfonsäure, 36 ml Äthylacetat p.a. und 12 ml Essigsäure-

anhydrid zusammensetzt. Wir rührten 15 Min. bei 50° Wasserbadtemperatur, verdünnten anschließend mit 5 ml Wasser und schüttelten dreimal mit Chloroform aus. Dieses wurde säurefrei gewaschen, getrocknet und abgedampft.

5. Methylierung

Die Methylierung der Hydroxy-Gruppe nahmen wir nach der Methode von KISHIMOTO und RADIN²²⁾ vor:

Dabei versetzten wir 35 mg Hydroxy-FS-ME mit 1 ml Methyljodid und 200 mg Silberoxyd. Diese Mischung erhitzen wir im Wasserbad bei 80° auf einem Magnetrührer. Nach 30 Min. gaben wir die gleiche Menge Jodid und Silberoxyd zu und nach weiteren 30 Min. erneut 200 mg Silberoxyd. Die Mischung wurde unter fortgesetzten Rühren noch 2 Stdn. erhitzt, dann 10 - 15 ml Chloroform zugegeben, vom Katalysator abfiltriert und im Vakuum eingedampft. Die anschließende Reinigung erfolgte über DC-Platten mit Benzin-Äther (7:3).

5. Ketonoxydation

Wir führten die Oxydation der Hydroxy-Gruppe mit Chromoxyd nach CHRISTIE und Mitarb.⁷⁵⁾ aus:

25 mg Hydroxy-FS-ME und 20 mg CrO_3 wurden durch Rühren in 1 ml Eisessig gelöst und 1 Stde. bei Zimmertemperatur belassen. Sodann gaben wir 10 ml Wasser zu und zerstörten das überschüssige Oxydationsmittel mit SO_2 . Die entstandene Ketosäure schüttelten wir mit Petroläther aus, wuschen diesen mit Wasser säurefrei, trockneten über Na_2SO_4 sicc. und dampften im Vakuum ab.

V. Abbau-Reaktionen

1. Permanganat-Perjodat-Abbau

Der Abbau erfolgte nach der von RUDLOFF⁸¹⁾ angegebenen Methode.

Für 10 mg Hydroxy-FS-ME und pro Doppelbildung verwendeten wir folgende Oxydationslösung:

4 ml tertiäres Butanol, 2.7 ml einer Permanganat-Perjodat-Lösung, bestehend aus 2.086 g NaJO_4 und 0.158 g KMnO_4 in 2.7 ml Wasser, 1.2 ml 0.02 n Kaliumcarbonatlösung und 6 ml Wasser wurden gemischt. Wir rührten zwei Stunden in einem geschlossenen Erlenmayerkolben, reduzierten mit SO_2 bis zur Rosafärbung und rührten nochmals eine halbe Stunde nach Zugabe von 2.5 ml n-Kalilauge unter Luftzutritt. Danach nutschten wir ab, engten im Rotationsverdampfer ein und säuerten den Rückstand mit Salzsäure an. Durch Ausschütteln mit Äther, der anschließend mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet wurde, gewannen wir die Säurebruchstücke. Zur Identifizierung durch DC und GC führten wir eine erneute Methylierung mit Diazomethan durch.

2. Chromsäure-Abbau

Mit der von MAEKINS und SWINDELLS⁸⁴⁾ verwendeten Methode führten wir den Abbau durch.

In einem Spitzkolben lösten wir 10 mg Mono-Hydroxy-FS-ME zusammen mit 15 mg Chromtrioxyd in 0.5 ml Eisessig. Diese Mischung brachten wir in ein 40° warmes Wasserbad. Nach 24 Stdn. brachen wir die Oxydation ab, indem wir nach Wasserzugabe den Oxydationsmittelüberschuß mit schwefliger Säure entfernten und die Säurebruchstücke mit Äther extrahierten. Die Ätherlösung wurde mit Wasser säurefrei gewaschen, über Na_2SO_4 sicc. getrocknet, eingedampft und erneut mit Diazomethan methyliert. Wurde der Abbau mit wenig Substanz durchgeführt, so schlossen wir direkt die

GC Untersuchung an. Im anderen Fall trennten wir die entstandenen Mono- und Dicarbonsäuren über DC-Platten (Benzin-Äther 7:3) und untersuchten beide Fraktionen getrennt.

Wolff-Kishner-Reduktion

Zur Bestimmung der Kettenlänge verwendeten wir eine direkte Wolff-Reduktion⁸⁵⁾, die wir zur Mikromethode modifizierten.

Zunächst hydrierten wir die Hydroxy-FS bzw. das Hydroxy-FS-Gemisch und führten anschließend eine Ketonoxydation durch, wie unter IV. 6., S.99, beschrieben. 10 mg so erhaltene Ketsäure-ME versetzten wir in einem Saugfinger mit 8 mg festem Kaliumhydroxyd, 0.01 ml 80% Hydrazinhydrat und 0.1 ml Triäthylenglykol. Diesen Saugfinger schlossen wir mittels eines gebogenen Zwischenstückes, das mit Asbestschnur umwickelt war, an einen mit Kalziumchlorid gefüllten Stutzen an. Die ganze Anlage wurde durch eine Wasserstrahlpumpe unter Vakuum gehalten, der Saugfinger bis zum Schliff in ein 180° heißes Ölbad getaucht und eine Stunde darin belassen (Abb. 47, S.102).

Anschließend erhöhten wir die Ölbadtemperatur auf 195° und erhitzten weitere 4 Stdn. Nach dem Erkalten verrührten wir die dunkelbraune teigige Masse mit wenig Wasser, säuerten mit 6 n HCl an und schüttelten dreimal mit Petroläther aus. Die vereinigten Petrolätherauszüge wuschen wir mit Wasser säurefrei, trockneten über Na_2SO_4 sicc. und dampften ab. Zur gaschromatographischen Identifizierung führten wir zum Schluß eine Methylierung mit Diazomethan durch, da der eingesetzte Methylester bei der Umsetzung gespalten wurde.

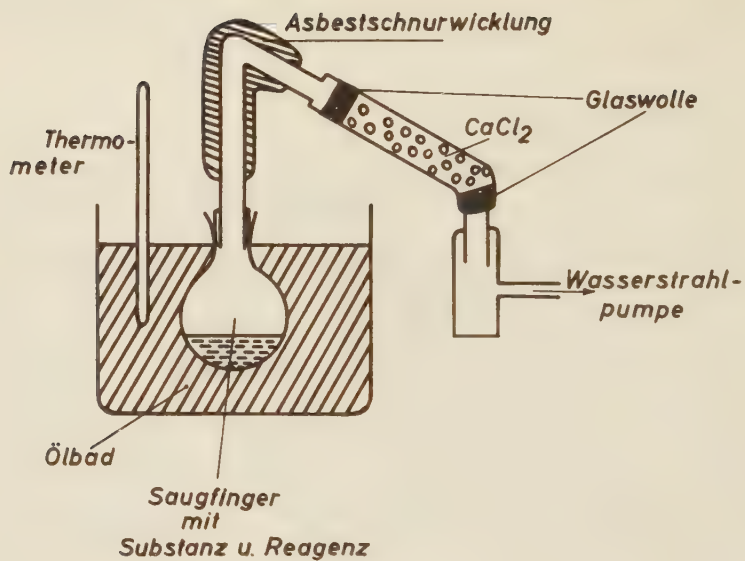


Abb. 47

Mikroapparatur für die Wolff-Kishner-Reduktion

VI. Reinigung und Absolutierung der Lösungsmittel

A c e t o n : Filtration über Al_2O_3 -Säule (basische Aktivitätsstufe I)

Ä t h e r : zu allen Arbeiten wurde peroxydfreier Äther verwendet, der durch Filtration über Al_2O_3 basisch Aktivitätsstufe I (1 Teil Al_2O_3 auf 10 Teile Äther) erhalten wurde.

B e n z i n : von Wundbenzin DAB 6 wurden die im Siedebereich von $40-60^\circ$ übergehenden Teile gesammelt und über Al_2O_3 (1:1) filtriert.

C h l o r o f o r m : CHCl_3 DAB 6 wurde zur Entfernung des Äthanols dreimal mit größeren Mengen Wasser ausgeschüttelt und über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und über 1/10 Teil Al_2O_3 filtriert.

M e t h a n o l : Destillation im Bereich von 64.5° und anschließende Al_2O_3 -Filtration (wie unter Äther)

P e t r o l ä t h e r : Destillation im Siedebereich von 30 bis 40° mit anschließender Al_2O_3 -Filtration (1:1)

P y r i d i n : für chromatographische Zwecke Merck wurde über KOH-Plätzchen destilliert.

T e t r a h y d r o f u r a n : Al_2O_3 -Filtration (wie unter Äther)

VII. Herkunft und Isolierung der Testsubstanzen

T a b e l l e 5

Substanz	Herkunft
16= ₀ OH ² α-Hydroxy-palmitins.	Fluka A.G., Chem. Fabrik Buchs SG.
26= ₀ OH ² α-Hydroxy-cerotins.	Schweiz
10= ₀ OH ³	Dr. Remboldt, Inst. f. Biochemie,
10= ₀ OH ¹⁰	Max Planck-Inst. München
10= ₀ OH ⁷	
14= ₀ OH ¹¹ Convolvulins.	Dr. G. Legler, Universität Bonn
16= ₀ OH ¹¹ Jalapinols.	
18-26= ₀ OH ²	isoliert aus Gehirncerebrosiden
	Isoliert aus den Samen von:
18= ₁ OH ⁹	Strophanthus gratus (Apocynaceae)
18= ₂ OH ⁹ Dimorphecols.	Dimorphothea aurantiaca (Compositae)
18= ₁ OH ¹² Ricinols.	Ricinus communis (Euphorbiaceae)
18= ₂ OH ¹³	Helichrysum bracteatum (Compositae)
18= ₃ OH ¹⁸ Kamolens.	Mallotus philipinensis (Euphorbiaceae)
14= ₀ OH ^{3,11} Ipurols.	Ipomoea purpurea (Convolvulaceae)
18= ₁₀ OH ¹²⁻¹³ Vernols.	Vernonia anthelmintica (Compositae)
18= ₀ OH ⁹	
18= ₀ OH ¹²	durch Hydrierung der entsprechenden
18= ₀ OH ¹⁸	ungesättigten Säuren
18= ₀ OH ¹²⁻¹³	
Ketosäuren	durch CrO ₃ -Oxydation der entsprechenden gesättigten Säuren
Monocarbonsäuren (6-26)	Institut für Pharm. Arzneimittel- lehre der Universität München
Dicarbonsäuren C ₃ - C ₉	
Heptadecanol	Fluka A.G., Chem. Fabrik Buchs SG. Schweiz

III. Untersuchung der Drogen

1. Dictiopteris polypodioides

Die in der Bucht von Neapel frisch gesammelte Alge wurde sofort mit Aceton und anschließend mit Chloroform-Methanol (2:1) extrahiert und der dunkelgrüne Rohextrakt*) unter Stickstoff in eine Glasampulle eingeschmolzen und bei -20° aufbewahrt. Dieser Rohextrakt wurde mit 1n Kalilauge unter Stickstoffbegasung verseift, der unverseifbare Anteil durch Petrolätherausschüttelung beseitigt und nach Ansäuern mit Salzsäure die freien FS durch Petrolätherextraktion gewonnen. Diese wurden sofort mit Diazomethan in ME überführt und mit einem Kohle-Seesandfilter von Farbstoffen befreit.

Diese gereinigten Gesamt-FS-ME hatten ein Gewicht von 273 mg. Durch präparative Auftrennung der 15%igen Chloroformlösung über eine Dickschichtplatte erhielten wir 42 mg Hydroxy-FS-ME und 37 mg Sterine.

20 mg der Hydroxy-FS-Fraktion wurden hydriert und davon 10 mg einer Wolff-Kishner-Reduktion mit anschließender GC unterworfen. Mit 7 mg des unhydrierten Gemisches (22 mg) wurde ein IR-Spektrum, mit 5 mg eine Silylierung durchgeführt. Die anschließende gaschromatographische Untersuchung des Substanzgemisches im Vergleich mit hydriertem und silyliertem Gemisch und Testsubstanzen der Kettenlänge C_{14} bis C_{16} , ergab eindeutig auf einer 15% EGSSX-Säule bei 175° Säulentemperatur als Hauptsubstanz eine ungesättigte C_{14} Hydroxy-FS neben geringen Mengen von ungesättigten C_{15} und C_{16} Hydroxy-FS.

Die zur exakten Strukturaufklärung neu gesammelten Algen wurden, ebenfalls in der Bucht von Neapel geerntet, sofort gefriergetrocknet und mit Chloroform-Methanol (2:1) auf dem Dampfbad extrahiert. (Algenextrakte II und III).

Die weitere Aufarbeitung dieser Extrakte erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist, waren darin keine Hydroxy-FS mehr vorhanden.

T a b e l l e 8

Algenextrakt	I	II	III
Gesammelt	März-April 1964	Mai 1966	Juni 1966
Gesamt-FS verunreinigt	380 mg	4.8 g	19.2 g
Hydroxy-FS	42 mg	-	-
Sterine	37 mg	+	+

2. Citrullus colocynthis

Je 2.5 kg Fruchtfleisch von *Citrullus colocynthis*, die von der Firma Carroux (Hamburg) bezogen wurden, pulverisierten wir. Die anschließende Extraktion wurde dreimal mit je 20 l Methanol in Siccotöpfen bei 70° bis 80° und 1.5 atü über 4 Stdn. durchgeführt. Danach preßten wir die voluminöse Droge aus, filtrierten und dampften den gelbbraunen Extrakt im Vakuum ein. Diesen Methanolextrakt behandelten wir viermal mit je 3 l Aceton unter Rückfluß und verseiften den von Lösungsmittel befreiten Acetonextrakt mit einer Lösung aus 300 g fester Kalilauge in 2 l Methanol 2 Stdn. auf dem Dampfbad. Nach dem Abkühlen der Seifenlösung verdünnten wir mit 3 l Wasser und schüttelten den Unverseifbaren zehnmal mit je 1 l Petroläther aus. Anschließend säuerten wir mit Salzsäure auf pH 2 an und gewannen die freien Gesamt-FS durch fünfmalige Ausschüttelung mit je 1 l Petroläther (siehe Tab. 9, S.107).

Chromatographische und spektrographische Untersuchungen siehe entsprechende Kapitel (S. 88 ff).

T a b e l l e 9

Tabelle der Extrakt- und Substanz-Ausbeuten:

	I		II	
1) Drogenpulver	2500.0 g		2500.0 g	
Methanolextrakt	790.0 g	31.0%	-	
2) Acetonextrakt	552.0 g		420.0 g	
	zu 1)	22.0%	zu 1)	17.0%
3) Freie Gesamt-FS	16.9 g		23.0 g	
	zu 1)	0.7%	zu 1)	0.9%
	zu 2)	3.1%	zu 2)	5.5%
4) Methylester	15.2 g		20.2 g	
	zu 1)	0.6%	zu 1)	0.9%
	zu 2)	2.9%	zu 2)	4.8%
	zu 3)	90.0%	zu 3)	90.0%
5) a) n-FS	4.7 g		12.6 g	
1 x über Platten				
b) Hydroxy-FS	0.68 g		0.55 g	
	zu 1)	0.027%	zu 1)	0.022%
	zu 2)	0.12%	zu 2)	0.13%
	zu 4)	4.5%	zu 3)	2.7%
6) Hydroxy-FS	0.40 g		0.34 g	
2 x über Platten	zu 1)	0.16%	zu 1)	0.12%

I = MeOH-Extraktion mit anschließender Acetonextraktion

II = direkte Acetonextraktion

Vergleichende Untersuchung einer Benzol- und einer Methanol-extraktion:

2000 g Drogenpulver wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel homogenisiert und dreimal mit 3 l unter Rückfluß gekocht. Den zur Trockene eingedampften Rohextrakt verseiften wir 24 Stdn. mit n-KOH bei 38° und gewannen durch Ansäuern und Ausschütteln mit Petroläther die Estersäuren. Der wässrige Rückstand wurde sodann 6 Stdn. auf dem Dampfbad erhitzt und die hydrolisierten FS mit Petroläther gewonnen (Tab. 10).

T a b e l l e 10

	Benzol	Methanol
Droge	200.0 g	200.0 g
Rohextrakt	5.1 g (gelb)	48.6 g (dunkelbraun)
FS:alkal.Verseifung	4.5 g	3.8 g
FS:saure Hydrolyse	0.6 g (gelb)	0.6 g (gelb)
n-FS-ME	0.021 g	0.019 g
α-Hydroxy-FS-ME	0.025 g	0.022 g

Hieraus ergibt sich ein Gehalt an α-Hydroxy-FS-ME von etwa 0.15%, so daß für eine komplette Analyse 500 - 600 g Droge erforderlich sind.

Dünnschichtchromatographie

der Cerebroside und Cerebrine⁶³⁾:

Laufmittel: CHCl₃-MeOH (9:1)

Sprühreagenz: Liebermann-Burchard

der Sphingolipidbasen⁶³⁾:

Laufmittel: CHCl₃-MeOH-Wasser (70:22:3) bzw. (65:25:4)

Sprühreagenz: Ninhydrin

3. Pinus species

200 g Pinienkerne wurden in einem Multimix zerkleinert, anschließend dreimal mit 1 l Chloroform 10 Min. homogenisiert und abgenutscht. Den Drogenrückstand extrahierten wir dreimal mit je 2 l einer Methanol-Wasser-Mischung (95:5) 2 Stdn. im Autoklaven bei 80° und 1.5 atü Druck. Der zähflüssige gelbliche Extrakt (19.7 g) wurde im Vakuum eingeeengt, während der Drogenrückstand verworfen wurde. Nach papierchromatographischer Überprüfung (Angaben siehe unten) verseiften wir den Rohextrakt mit 100 ml einer 10% wässrigen Kalilauge bei 37° 24 Stdn. lang. Durch dreimalige Ausschüttelung mit 200 ml Petroläther entfernten wir die Phosphatidsäure, säuerten mit 6n Salzsäure an und hydrolysierten 6 Stdn. auf dem Dampfbad. Nach dem Erkalten gewannen wir die Phytoglykolipid-Gesamt-FS (0.8 g, verunreinigt) durch dreimalige Ausschüttelung mit Petroläther, dem 5% Äther zugesetzt waren.

Die DC der freien FS ergab mit dem Laufmittel Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (90:10:2) und Eisen(II)chlorid-Ammonrhodanid-Lösung als Sprühmittel eindeutig α -Hydroxy-FS. Nach erfolgter präparativer Auftrennung der 15% Chloroformlösung über zwei Dickschichtplatten und anschließender Reinigung aus Aceton durch Tiefkühlkristallisation bei -25°, erhielten wir 122 mg α -Hydroxy-FS und 80 mg n-FS. Die DC und GC Analysen, sowie die IR- und NMR-Spektren wurden, wie unter Citrullus colocynthis bzw. den einzelnen Kapiteln genau beschrieben, durchgeführt.

P a p i e r c h r o m a t o g r a p h i e d e r P h y t o - g l y k o l i p i d e :

Papier:	Formaldehydpapier ⁸⁸⁾⁸⁹⁾
Trennsystem:	Tetrahydrofuran-Diisobutylketon-Wasser (45:5:6) 88)
Laufhöhe:	18 cm
Laufzeit:	90 Min.
Identifizierung:	Einlegen in 0.05% Nilblaulösung. Anschließend Auswaschen mit Wasser, dunkelblaue Flecke auf hellblauen Grund.

R_f der Phytoglykolipide: 0.20 - 0.25.

A N H A N G

T a b e l l e 1

Vorkommen von Hydroxysäuren im Pflanzen- und Tierreich
(geordnet nach Familien)

I. Pflanzenreich

A. Niedere Pflanzen:

	Säuren	Lit.
<u>Bakterien:</u>		
Bacillus megatherium	$(4=_{\text{O}}\text{OH}^3)_n$	90)
B. cereus		
B. mycoides		
B. anthracis		
Pseudomonas pyocyanea	$10=_{\text{O}}\text{OH}^3, 12=_{\text{O}}\text{OH}^3$	90)
P. viscosa	$10=_{\text{O}}\text{OH}^3$	90)
Escherichia coli	$14=_{\text{O}}\text{OH}^{\text{Di}}$	90)
Lactobacillus acidophylus	$18=_{\text{O}}\text{OH}^{\text{Di}}$	90)
Azobacter agilis		91)
Odium lactis		92)
Serratia marcescens	$10=_{\text{O}}\text{OH}^3, 10=_{\text{1}}\text{OH}^3,$ $12=_{\text{O}}\text{OH}^3$	3)
Corrynobacterium diptheriae	$31=_{\text{O}}\text{OH}^3, 32=_{\text{1}}\text{OH}^3$	90)93)
Nocardia asteroides	$50=_{\text{3}}\text{OH}^3$	90)
Mycobacterium tuberculosis	$88=_{\text{O}}\text{OH}^3$	90)94)95)
M. leprae		96)
Calmette-Guerin-Bacillus	$25=_{\text{3}}\text{OH}^3$	97)
<u>Hefen und Pilze:</u>		
Rhodotorula graminis	$16=_{\text{O}}\text{OH}^3, 18=_{\text{O}}\text{OH}^3$	90)98)
Torulopsis magnoliae	$18=_{\text{O}}\text{OH}^{17}, 18=_{\text{1}}\text{OH}^{17}$	90)99)
Saccharomyces cerevisiae	$22=_{\text{OH}}\text{OH}^2, 24=_{\text{O}}\text{OH}^2$	100)
Penicillium	$24=_{\text{O}}\text{OH}^2, 24=_{\text{O}}\text{OH}^{2,3}$	101)
Claviceps purpurea (=Secale cornutum)	$18=_{\text{1}}\text{OH}^{12}$ $22-24=_{\text{O}}\text{OH}^2$	90)98)102) 103)

Poria tenuis	$11 = \frac{2}{2} \frac{2}{2} OH^4$	}	11)104)
P. corticola	$12 = \frac{2}{2} \frac{2}{3} OH^4$		

Sporenöle von:

Puccinia graminis var. tritici

Phragmites speciosum	$18 =_0 OH^{9,10}$	90)105)
----------------------	--------------------	---------

Cronartium harkesii

Melampsora lini
M. medue

Lycopodiales

Lycopodium clavatum	$16 =_0 OH^8, 18 =_0 OH^{9,10}$	90)106)
---------------------	---------------------------------	---------

B. Höhere Pflanzen:

a) Polycotyledonae:

Cupressaceae:

Juniperus rigida	$24 =_0 OH^{24}$	108)
------------------	------------------	------

J. communis

J. sabina

Thuja occidentalis

$12 =_0 OH^{12}, 16 =_0 OH^{16}$	107)
----------------------------------	------

Coniferae:

Picea abies

P. excelsa

$12 =_0 OH^{12}, 16 =_0 OH^{16}$	107)
----------------------------------	------

Abies concolor

$14 =_0 OH^{13}$	109)
------------------	------

Pseudotsuga taxifolia

$12 =_0 OH^{11}$	82)
------------------	-----

Pinus silvestris

$14 =_0 OH_2 \text{ bis } 25 =_0 OH^2$	eigen
--	-------

b) Dicotyledonae:

Lauraceae:

Cryptocaria massoia

$10 =_1 OH^5$	110)
---------------	------

Rosaceae:

Malus spec.

$16 =_0 OH^{16}, 18 =_0 OH^{10,16},$ $18 =_0 OH^{9,10,18}$	26)35)
$10 =_0 OH^{10} \dots 22 =_0 OH^{22}$	

Leguminosae:

Desmodium gangeticum

$16 =_0 OH^4$	114)
---------------	------

Cassia absus

Ceridium floribundum

Calliandra eriophylla

$18 =_2 OH^9$	112)113)
---------------	----------

Soja hispida
Arachis hypogea

$$\left. \begin{array}{l} 24 = {}_0\text{OH}^2 \\ 22, 24, 26 = {}_0\text{OH}^2 \end{array} \right\} 63)114)$$

Brassicaceae (=Cruciferae)

Lesquerella densipila
L. lyrata
L. perforata
L. stonensis
L. lescurii
L. recurvata
L. fendleri
L. lasiovarpa

$$\left. \begin{array}{l} 18 = {}_2\text{OH}^{12} \\ 20 = {}_1\text{OH}^{14} \\ 20 = {}_1\text{OH}^{11} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 57)115) \\ 116)117) \\ \end{array}$$

Cardamina impatiens

$$\begin{array}{l} 18 = {}_0\text{OH}^{9,10}, 18 = {}_0\text{OH}^{15,16} \\ 20 = {}_0\text{OH}^{11,12}, 22 = {}_0\text{OH}^{13,14} \end{array} 117)118)$$

Malvaceae:

Hibiscus abelmoschus

$$16 = {}_1\text{OH}^{16} 119)$$

Apiaceae (=Umbelliferae)

Angelica archangelica

$$15 = {}_0\text{OH}^{15} 119)$$

Betulaceae:

Betula verrucosa

$$\left. \begin{array}{l} 18 = {}_1\text{OH}^{18}, 18 = {}_0\text{OH}^{9,10}, {}_0\text{OH}^{18} \\ 18 = {}_0\text{OH}^{9,10,18}, 22 = {}_0\text{OH}^{22} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 120)121) \\ 122)123) \end{array}$$

Fagaceae:

Quercus suber

Euphorbiaceae:

Ricinus communis

$$18 = {}_1\text{OH}^{12}, 18 = {}_0\text{OH}^{9,10} \begin{array}{l} 125)126)21) \\ 128)129) \end{array}$$

Mallotus phillipinensis

$$18 = {}_3\text{OH}^{18} 129)130)$$

Cephalocroton cordofanus

$$18 = {}_1\text{OH}^{12,13} 131$$

Coriariaceae:

Coriaria nepalensis

$$18 = {}_2\text{OH}^{13} 175)$$

Santalaceae:

Acanthosyris apinescens

$$17 = {}_2\text{OH}^7 132)$$

Santalum album

$$18 = {}_2\text{OH}^8 133)$$

Oleaceae:

Ximenia caffra

$$16 = {}_1\text{OH}^8 134)135)$$

Onguekoa gore

$$\left\{ \begin{array}{l} 18 = {}_2\text{OH}^8, 18 = {}_2\text{OH}^8 \\ 18 = {}_2\text{OH}^8, 18 = {}_0\text{OH}^{9,10} \end{array} \right. 112), 136)60)$$

Agonandra brasiliensis	18= ₁ OH ¹²	137)
Olea europaea	16= ₀ OH ^{10,16} , 18= ₀ OH ^{9,10,18}	84)138)
Ligustrum japonicum		

Apocynaceae:

Strophantus amboensis		
S. congoensis		
S. courmentii		
S. emusii		
S. gratus		
S. hispidus		
S. intermedius		
S. nicholsonii	18= ₁ OH ⁹	112)139)140)
S. sarmentosus		112)
S. schuchardtii		
S. thollonii		
S. verucosus		
S. welwitschii		
Wrightia annamensis		112)

Convolvulaceae:

	14= ₀ OH ^{3,11} , 14= ₀ OH ¹¹ , 16= ₀ OH ¹¹	
Ipomoea purpurea	x	141-143)64)
I. purga	x	x 144)
I. operculata		x
I. orizabense	x	x 145)
I. simulans	x	x
I. fistula	x	x 40)
Convolvulus scammonia	x	x 145)
Pharbitis nil Chois	x	147)
Merremia tuberosa	14= ₀ OH ^{Tri} , 16= ₀ OH ^{3,12}	146)
Operculina macrocarpa		

Boraginaceae:

Lithospermum officinale	14= ₀ OH, 20= ₃ OH, 25= ₁ OH	148)
-------------------------	---	------

Valerianaceae:

Valeriana officinalis	6= ₀ OH ²	149)
-----------------------	---------------------------------	------

Cucurbitaceae:

Citrullus colocynthis	14....26= ₀ OH ²	eigen
-----------------------	--	-------

Compositae:

Dimorphotheca aurantiaca	18= ₂ OH ⁹	113)
D. chrysantemifolia		
D. cumata		
D. pluvialis		150)
D. sinuata		
D. zeykeri		

Castalis medicaulis	}	$18=2OH^9$	
Ostoopermum caulescans			
O. dregei			
O. eckloni			
O. fruticosum			
O. jucundum			
Calendula officinalis		$18=2OH^9$	151/152)
Tragopogon porrifolius	}	$18=2OH^9, 18=2OH^{13}$	152)
Artemisia absinthium			153) 154)
Helianthus annuus			154)
Cosmos bipinnatus			154)
Helichrysum bracteatum		$18=1=1OH^9$	155) 156)

c) Monocotyledonae:

Liliaceae:

Agave mexicana	$18=0OH^{18}, 18=1OH^{18}, 18=0OH^{10,18}, 18=0OH^9, 10, 18=0OH^{10,18}$	157)
----------------	--	------

Poaceae (Gramineae)

Zea mays	$26=0OH^2$	114)
----------	------------	------

Zygophyllaceae:

Balanites aegyptica	$18=2OH^9$	154)
---------------------	------------	------

Zingiberaceae:

Gmelina aegyptica	$18=1OH^{12}$	112)
-------------------	---------------	------

Palmae:

Copernicia cerifera	$10....30=0OH^{30}$	35)
---------------------	---------------------	-----

II. Tierreich

Hymenoptera:

Apis mellifica	Wachs: $16=0OH^{14}, 16=0OH^{15}$	158) 159)
	Mandibeln: $10=1OH^{10}$	160-163)

Mamalia:

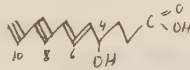
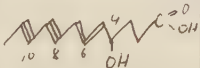
Ovis dom.	Wollwachs: $13....25=0OH^2, 26...34=0OH^{34}$	164-168)
Sus scrofa	Gehirn: $22....26=0OH^2, 23...26=1OH^2$	169)

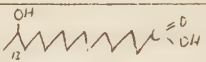
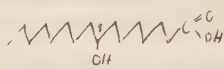
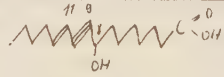
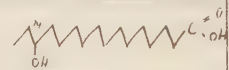
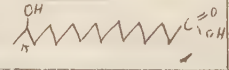
Homo sapiens:

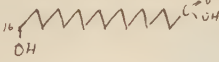
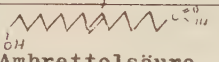
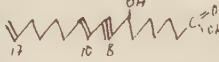
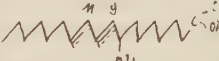
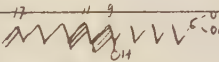
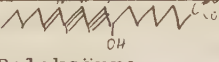
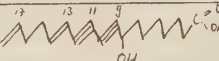
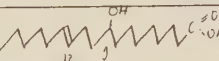
Gehirn:	$22...25=0OH^2, 21...26=1OH^2$	22) 170-173)
Faecalien:	$18=0OH^{10(6,7,8,9)^1}$	174)

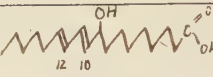
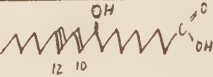
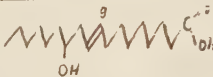
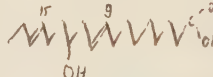
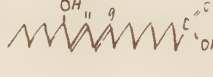
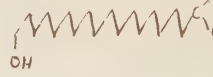
T a b e l l e 2

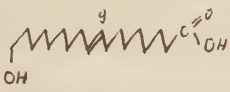
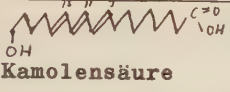
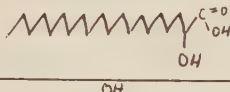
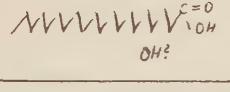
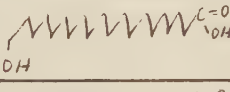
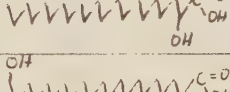
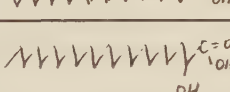
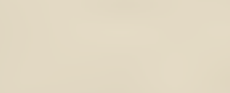
Vorkommen von Hydroxysäuren (geordnet nach der Kettenlänge)
Literaturangaben siehe Tab. 1 unter den betreffenden Familien.

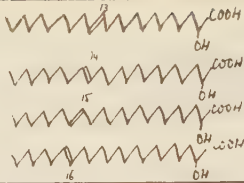
I. Mono-Hydroxy-FS				
Brutto-	Strukturformel	Vorkommen	Droge	% d.Ges. Säuren
$(4=0\text{OH}^3)_n$		Bacillus spec. <u>Bacteria</u>		
$9=1\text{OH}^9$		Apis mellifica <u>Hymenoptera</u>	Mandibeln	
$10=1\text{OH}^2$				
$10=0\text{OH}^3$		Pseudomonas pyocyana P. viscosa Serratia marcescens <u>Bacteria</u>		
$10=1\text{OH}^3$		Serratia marcescens		
$10=0\text{OH}^7$		Ipomoea fistula <u>Convolvulaceae</u>	Blatt- harze	
$10=0\text{OH}^{10}$		Malus spec. <u>Rosaceae</u> Copernicia cerifera <u>Palmae</u>	Cuticula Wachs	
$11=2=2\text{OH}^4$		Poria tenuis <u>Basidiomycetes</u>		
$12=0\text{OH}^3$		Pseudomonas pyoceanea Serratia marcescens		
$12=2=2\text{OH}^4$		Poria corticolo <u>Basidiomycetes</u>		
$12=0\text{OH}^{11}$		Pseudotsuga taxifolia <u>Coniferae</u>	Rinde	

12=0OH ¹²		Juniperus spec., Thuja <u>Cupressaceae</u> Picea, Pinus <u>Coniferae</u> Malus <u>Rosaceae</u> Copernicia cerifera <u>Palmae</u>	Harz	
14=0OH ¹¹		Ipomoea spec. Convolvulus scammonia <u>Convolvulaceae</u> Malus spec. <u>Rosaceae</u>	Harz	
14=0OH ¹³		Abies concolor <u>Coniferae</u>	Rinde	
14=0OH ¹⁴		Malus spec., <u>Rosaceae</u>		
15=0OH ¹⁵		Angelica archangelica <u>Apiaceae</u>	Wurzel	
16=0OH ²		Citrullus coloc. <u>Cucurbitaceae</u> Pinus spec. <u>Coniferae</u>	Frucht Samen	
16=0OH ³		Rhodotorula gramminis <u>Hefen</u>		
16=0OH ⁸		Lycopodium clavatum <u>Lycopodiaceae</u>	Sporen- öl	
16=1=1OH ⁸		Ximenia caffra <u>Oleaceae</u>	Samen	
16=0OH ¹¹		Ipomoea spec. Convolvulus scammonium <u>Convolvulaceae</u>	Harze	
16=0OH ¹⁴		Apis mellifica <u>Hymenoptera</u>	Wachs	
16=0OH ¹⁵		dto.		

16= ₀ OH ¹⁶	 Juniperinsäure	Juniperus spec. Thuja occidentalis <u>Cupressaceae</u> Picea spec. Pinus silvestris <u>Coniferae</u> Malus spec. <u>Rosaceae</u> Copernicera cer. <u>Palmae</u>	Harze	
16= ₁ OH ¹⁶	 Ambrettolsäure	Abelmoschus moschata <u>Malvaceae</u>	Samenöl	
17= ₂ ⁼ ₁ OH ⁷		Acanthosyris spinescens <u>Santalaceae</u>	Samenöl	10%
18= ₀ OH ²		Cerebroside des Menschen und Säugern Citruillus colcyntthis <u>Cucurbitaceae</u> Pinus spec. <u>Coniferae</u>	Gehirn	
18= ₀ OH ³		Rhodotorula spec.		15%
18= ₂ OH ⁸		Santalum album, <u>Santalaceae</u> Onguekoa kleineana O. <u>Oleaceae</u>	Öl	
18= ₂ ⁼ ₁ OH ⁸	 Isanolsäure  Boleksäure	Onguekoa gora <u>Oleaceae</u>	Öl	15%
18= ₂ ⁼ ₂ OH ⁸		Onguekoa gore <u>Oleaceae</u>	Öl	2%
18= ₁ OH ⁹		Strophanthus <u>Apocynaceae</u> sarmentosus hispidus courmentii nicholsonii eminii verrucosus amboensis schuchardtii gratus, welwitschii, thollonii, congoensis intermedius	Samenöl	6%
				15%
				10%
				9%
				14%
				6%
				9%
				12%
				10%
				10%
				10%

$18=2OH^9$		Dimorphotheeca spec. davon <i>D.aurantiaca</i> <i>Oestospermum</i> spec. <i>Castalis nudicaulis</i> <i>Calendula officinalis</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Cosmos lipinatus</i> <i>Tragopogon porrifolius</i> <u>Compositae</u> <i>Balanites aegyptica</i> <u>Zygophyllaceae</u>	Samenöl	66%
	Dimorphecalsäure			5%
$18=1OH^9$		<i>Helichrysum bracteatum</i> <u>Compositae</u>	Samenöl	
$18=1OH^{12}$		<i>Ricinus communis</i> <u>Euphorbiaceae</u> <i>Agonandra brasiliensis</i> <u>Oleaceae</u> <i>Wrightia amansensis</i> <u>Apocynaceae</u> <i>Gmelina asiatica</i> <u>Zingiberaceae</u> <i>Secale cornutum</i> (=Claviceps purpurea)	Samenöl Samenöl Samenöl Sklerotium	90% 50% 35%
	Ricinolsäure			11%
$18=2OH^{12}$		<i>Lesquerella lyrata</i> L. <i>perforata</i> L. <i>stonensis</i> L. <i>densipila</i> , <i>lescurii</i> <u>Brassicaceae</u>	Samenöl	36% 37% 39%
	Densipolsäure			
$18=2OH^{13}$		<i>Tragopogon porrifolius</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Cosmos lipinatus</i> <u>Compositae</u> <i>Coriaria nepalensis</i> <u>Coriariaceae</u>	Samenöl	4%
$18=0OH^{17}$		<i>Torolpsis magnoliae</i>		
$18=1OH^{17}$				
$18=0OH^{18}$		<i>Agave mexicana</i> <u>Liliaceae</u> <i>Copernicia cer.</i> <u>Palmae</u> <i>Malus</i> spec. <u>Rosaceae</u>	Cuticula Wachs	

18= ₁ OH ¹⁸		Quercus suber, <u>Fagaceae</u> Betula verr. <u>Betulaceae</u> Agave mexicana, <u>Liliaceae</u>	Kork Cuticula Cuticula	
18= ₃ OH ¹⁸		Mallotus phillipinensis <u>Euphorbiaceae</u>	Samenöl	
20= ₀ OH ²		Citrullus colocynthis Pinus spec. <u>Coniferae</u>	Frucht Samen	
20= ₁ OH ¹¹		Lesquerella spec. <u>Brassicaceae</u>	Samenöl	
20= ₁ OH ¹⁴		Lesquerella lasiocarpa L. recurvata L. densipla, lyrata, perforata, stonensis <u>Brassicaceae</u>	Samenöl Samenöl Samenöl	50% 71% 7-10%
20= ₃ OH		Lithospermum offic. <u>Boraginaceae</u>	Fruchtfett	
20= ₀ OH ²⁰		Copernicia cer. <u>Palmae</u> Malus spec. <u>Rosaceae</u>	Wachs	
21= ₀ OH ²		wie 20= ₀ OH ²		
21= ₀ OH ²¹		Malus spec. <u>Rosaceae</u>		
22= ₀ OH ²		wie 20= ₀ OH ² Mensch, Schwein Secale cornutum Arachis hypogea <u>Fabaceae</u> Saccharomyces Penicillium	Gehirn Sklerotium Same	
22= ₀ OH ²²		Quercus suber, <u>Fagaceae</u> Copernicia cerifera <u>Palmae</u>	Kork Wachs	
23= ₀ OH ²		wie 22= ₀ OH ² ohne Saccharomyces und Penicillium		

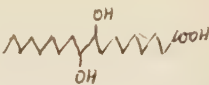
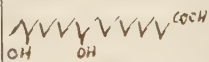
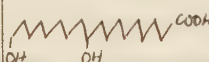
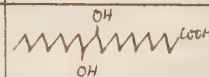
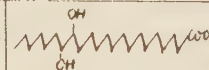
23= ₁ OH ²		Mensch, Schwein	Gehirn
24= ₀ OH ²	Cerebronsäure	wie 22= ₀ OH ² ohne Penicillium mit Soja hispida <u>Fabaceae</u> Same	
24= ₁ OH ²	Δ 14 Δ 15 Δ 17	wie 23= ₀ OH ²	
24= ₀ OH ²⁴		Juniperus rigida <u>Cupressaceae</u> Copernicia cerifera <u>Palmae</u>	Wachs
25= ₁ OH ²	Δ 15 Δ 16 Δ 17 Δ 18	wie 23= ₀ OH ²	
25= ₁ OH		Lithospermum offic. <u>Boraginaceae</u>	Frucht
26= ₀ OH ²	Oxycerotinsäure	Mensch, Schwein Citrullus coloc. <u>Cucurb.</u> Arachis hyp. <u>Fabaceae</u> Zea mays <u>Poaceae</u> Hefen	Gehirn Frucht Same Same
26= ₁ OH ²	Δ 16 Δ 17 Δ 19	Schwein	Gehirn
26= ₀ OH ²⁶ 28= ₀ OH ²⁸ 30= ₀ OH ³⁰		Copernicia cerifera <u>Palmae</u>	Wachs

erzweigtkettige Mono-Hydroxy-FS:

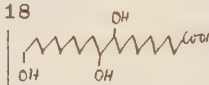
$=_0\text{OH}^2$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COOH} \end{array}$	Valeriana officinalis <u>Valerianaceae</u>	Wurzel
$=_0\text{OH}^3$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{C}_7\text{H}_{13}}{\text{CH}}-\text{COOH} \end{array}$ Corynomycolsäure	Corynobacterium diptheriae Bacteria	Wachs
$=_1\text{OH}^3$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\underset{\text{OH}}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{C}_7\text{H}_{13}}{\text{CH}}-\text{COOH} \end{array}$ Corynomycolensäure		
$=_3\text{OH}$	Nocardsäure	Nocardia asteroides <u>Bact.</u>	
$=_0\text{OH}^3$	$\begin{array}{c} \text{R}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{C}_{24}\text{H}_{49} \quad \text{R}=\text{C}_{60}\text{H}_{127}+\text{CH}_2 \end{array}$ Mycolsäure	Mycobacteria spec.	Wachs

II. Di-Hydroxy-FS

$=_0\text{OH}^{3,11}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{C}_{11} \quad \text{C}_5 \end{array}$ Ipurolsäure	Ipomoea fistula I. purpurea Pharbitis nil Chois <u>Convolvulaceae</u>	Blattharze Harz
$=_0\text{OH}$		Escherichia coli <u>Bacteria</u>	
$=_0\text{OH}^{3,12}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{C}_{12} \end{array}$ Operculinsäure	Operculina macrocarpa Meremia tuberosa <u>Convolvulaceae</u>	Harz
$=_0\text{OH}^{10,16}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{C}_{16} \quad \text{C}_{10} \end{array}$	Olea europaea Ligustrum japonicum <u>Oleaceae</u>	Cuticula Cuticula

18=0OH ^{9,10}		Cardamine impat. <u>Brassicaceae</u> Ricinus comm. <u>Euphorbiaceae</u> Onguekoa gore <u>Oleaceae</u> Lycopodium clavatum Puccinia graminis var. tritici Phragmites speciosum Cronartium harkensii Melampsora lini, meduae	Öl Öl Sporenöl Teleuto- sporenöl " Aecidio- Uredo-	1.2% 4%
18=0OH ^{10,16}		Malus spec. <u>Rosaceae</u>	Fruchtschale	
18=0OH ^{10,18}		Agave mexicana <u>Liliaceae</u>	Cuticula	
18=1OH ^{12,13}		Cephalocroton cordofanus <u>Euphorbiaceae</u>	Samenöl	4%
18=0OH ^{15,16}		Cardamine impatiens <u>Brassicaceae</u>	Samenöl	6%
18=0OH		Lactobacillus acidophilus <u>Bacteria</u>		
20=0OH ^{11,12}		Cardamine imp. <u>Brassicaceae</u>		1.2%
22=0OH ^{13,14}				16%

III. Tri-Hydroxy-FS

14=0OH	Brisiolsäure	wie 16=0OH ^{3,12}		
18=0OH ^{9,10,18}		Quercus suber, <u>Fagaceae</u> Olea europ. <u>Oleaceae</u> Ligustrum J. <u>Oleaceae</u> Malus spec. <u>Rosaceae</u> Agave mexicana <u>Liliaceae</u>	Kork Cuticula Cuticula Schale Cuticula	
18=0OH ^{9,10,18}	Phloinsäure	Quercus suber <u>Fagaceae</u>	Kork	

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) F.LYNEN u. M.TADA, Angew.Chem. 73, 513 (1961)
- 2) G.SCHEUERBRANDT, H.GOLDFINE, P.E.BARANOWSKY u. K.BLOCH, J.Biol.Chem. 236, PC70 (1961)
- 3) D.G.BISHOP u. J.L.STILL, J.Lip.Res. 4, 87 (1963)
- 4) E.L.PUGH, F.SAUER, MOSELEY WAITE, R.E.TOOMEY u. SALIK I.WAKIL, J.Biol.Chem. 241, 2635 (1966)
- 5) H.S.MASON, Advances in Enzymol. 19, 79 (1957)
- 6) W.STOFFEL u. H.G.SCHIEFER, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 345, 41 (1966)
- 7) A.T.JAMES, H.C.HADAWAY u. J.P.WEBB, Biochem.J. 95, 448 (1965)
- 8) A.T.JAMES, R.V.HARRIS, C.HITCHCOCK, J.B.WOOD u. D.W.NICHELS, Fette-Seifen-Anstrichmittel 67, 393 (1965)
- 9) D.H.S.HORN, F.W.HOUGEN, R.van RUDLOFF u. D.A.SUTTON, J.Chem. 27, 1349 (1955)
- 10) W.R.NOBLE, A.EISNER u. J.T.SCAULAN, J.Am.Oil Chemist's Soc. 37, 14 (1960)
- 11) J.D.BU LOCK, E.R.JONES u. P.R.LEEMING, J.Chem.Soc. 1097 (1957)
- 12) M.MATIC, Biochem.J. 63, 168 (1956)
- 13) M.J.DIAMOND, R.E.KNOWLES, R.G.BINDER u. L.A.GOLDBLATT, J.Am.Oil Chemist's Soc. 41, 430 (1964)
- 14) A.H.MILBURN, E.V.TRUTER, J.Appl.Chem. 12, 156 (1962)
- 15) Y.KISHIMOTO u. N.S.RADIN, J.Lip.Res. 4, 130 (1963)
- 16) E.N.FRANKEL, D.G.Mc.CONNELL, u. C.D.EVANS, J.Am.Oil Chemist's Soc. 39, 297 (1962)
- 17) V.J.ESAFOV u. Z.J.TORGASHINA, J.Gen.Chem.(U.S.S.R.) 8, 1594 (1938); C.A. 33, 4583 (1939)
- 18) A.J.FULCO u. J.F.MEAD, J.Biol.Chem. 236, 2416 (1951)
- 19) F.D.GUNSTONE u. P.J.SYKES, J.Chem.Soc. (1960) 5050
- 20) B.PREISS u. K.BLOCH, J.Biol.Chem. 239, 85 (1964)
- 21) R.G.BINDER, T.H.APPLEWHITE, G.O.KOHLER u. L.A.GOLDBLATT, J.Am.Oil Chemist's Soc. 39, 513 (1962)
- 22) Y.KISHIMOTO, N.S.RADIN, J.Lip.Res. 1, 72 (1959)
- 23) F.W.HOUGEN, Biochem.J. 59, 302 (1955)
- 24) W.W.CHIRSTIE, F.D.GUNSTONE u. H.G.PRENTICE, J.Chem.Soc.(London) 5768 (1963)
- 25) V.T.RAUHULA, J.Am.Oil Chemist's Soc. 38, 233 (1961)
- 26) P.MARZLIAK, Phytochemistry 2, 253 (1963)
- 27) L.J.MORRIS, H.HAYNES u. R.T.HOLMAN, J.Am.Oil Chemist's Soc. 38, 316 (1961)
- 28) B.DE VRIES, ibid. 40, 184 (1963)
- 29) C.F.WURSTER Jr., J.H.COPERHYVER Jr. u. P.R.SHAFFER, ibid. 40, 513 (1963)
- 30) E.A.EUKEN, C.R.SCHOLFIELD H.J.DULTON, ibid. 41, 388 (1964)
- 31) G.ROUSER, A.J.BAUMAN, N.NICOLAIDES u. D.HELLER, ibid. 38, 565 (1961)
- 32) H.P.KAUFMANN u. Y.S.KO, Fette-Seifen-Anstrichmittel 64, 434 (1962)
- 33) V.P.SKIPSKI, S.M.ARFIN u. M.M.RAPPORT, Arch.Biochem u. Biophys. (Amsterdam) 87, 259 (1960)

- 34) R.SUBARAO, K.T.ACHAYA, J.Chrom. 16, 235 (1964)
- 35) C.H.BRIESKORN u. L.RÖSS, Fette-Seifen-Anstrichmittel 66, 925 (1964)
- 36) E.KLENK, M.DOSS, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 342, 187 (1965)
- 37) E.VIOQUE u. R.T.HOLMAN, J.Am.Oil Chemist's Soc. 39, 63 (1962)
- 38) R.G.BINDER, T.H.APPLEWHITE, M.J.DIOMOND u. L.A.GOLDBLATT, J.Am.Oil Chemist's Soc. 41, 108 (1964)
- 39) D.SGOUTAS, F.A.KUMMEROW, J.Am.Oil Chemist's Soc. 40, 138 (1963)
- 40) G.LEGLER, Phytochem. 4, 29 (1965)
- 41) K.RANDERATH, Dünnschichtchrom. 124, Verlag Chemie (Weinheim) 1962
- 42) H.JATZKEWITZ u. E.MEHL, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 320, 251 (1960)
- 43) L.MORRIS, J.Chrom. 12, 321 (1963)
- 44) B.DE VRIES u. G.JUNTIENS, Fette-Seifen-Anstrichmittel 65, 725 (1963)
- 45) F.D.GUNSTONE u. A.I.SEALY, J.Chem.Soc.(London) 5772 (1963)
- 46) L.MORRIS, J.Chem.Soc. (London) 5779 (1963)
- 47) T.K.MIWA, K.L.MIKOLAJCZAK, F.R.EARLE u. I.A.WOLFF, Anal.Chem. 32, 1739 (1960)
- 48) T.K.MIWA, J.Am.Oil Chemist's Soc. 40, 309 (1963)
- 49) C.LITCHFIELD, R.REISER u. A.F.ISBELL, J.Am.Oil Chemist's Soc. 40, 302 (1963)
- 50) H.P.KAUFMANN, G.MANKEL u. K.LEHMANN, Fette-Seifen-Anstrichmittel 63, 1109 (1961)
- 51) I.S.O'BRIEN u. G.ROUSER, Analyt.Biochem. 7, 288 (1964)
- 52) L.I.MORRIS, R.T.HOLMAN u. K.FONTELL, J.Lip.Res. 1, 412 (1960)
- 53) Y.KISHIMOTO u. N.S.RADIN, J.Lip.Res. 5, 92 (1964)
- 54) S.OKUI u. M.UCHIYAMA, Biochim.Biophysica Acta 70, 346 (1963)
- 55) M.UCHIYAMA, R.SATO u. M.MUZIGAKI, Biochim.Biophysica Acta 70, 344 (1963)
- 56) F.R.EARLE, I.A.WOLFF, C.A.GLASS u. Q.JONES, J.Am.Oil Chemist's Soc. 39, 381 (1962)
- 57) K.L.MIKOLAJCZAK, F.R.EARLE u. I.A.WOLFF, J.Am.Oil Chemist's Soc. 39, 78 (1962)
- 58) M.J.CHISHOLM u. C.Y.HOPKINS, Can.J.Chem. 38, 2500 (1960)
- 59) L.DUHAMEL, Am.Chim. 13, 315 (1963)
- 60) F.D.GUNSTONE u. A.J.SEALY, J.Chem.Soc. 5772 (1963)
- 61) L.MORRIS, ibid. 5779 (1963)
- 62) R.D.WOOD, P.K.RAJU, R.REISER, J.Am.Oil Chemist's Soc. 42, 81 (1965)
- 63) W.ZOFCSIK, Diss.München 1965
- 64) H.AUTERHOFF u. H.DENLEITNER, Arzneimittel-Forsch. 5, 402 (1955)
- 65) P.POHL, Diss.München 1965
- 66) R.VOGEL, Fette-Seifen-Anstrichmittel 57, 393 (1953)
- 67) W.R.MORRISON u. L.M.SMITH, J.Lip.Res. 5, 600 (1964)
- 68) J.M.HAIS u. K.MACEK, Handbuch der Papierchrom. Bd.I, VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 748 (1958)
- 69) E.MERCK, Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchrom. S. 23
- 70) L.J.MORRIS u. D.M.WHARRY, J.Chrom.(Amsterdam) 20, 27 (1965)
- 71) B.TSCHESCHE, G.BIERNROTH u. G.WULFF, J.Chrom.(Amsterdam) 12, 342 (1963)

- 72) H.KÖNIG, Diss.München 1962
- 73) H.P.KAUFMANN u. Y.SUKO, Fette-Seifen-Anstrichmittel 63, 828 (1961)
- 74) H.LINDLAR, Helv.Chim.Acta 35, 446 (1952)
- 75) W.W.CHRISTIE, F.D.GUNSTONE u. H.G.PRENTICE, J.Chem.Soc. (London) Pergamon Press 5768 (1963)
- 76) R.D.WOOD, D.K.RAJU u. R.REISER, J.Am.Oil Chemist's Soc. 42, 161 (1965)
- 77) J.S.FRITZ, G.H.SCHENK, Anal.Chem. 31, 1808 (1959)
- 78) R.S.STETZER u. C.F.SMULLIN, Anal.Chem. 34, 194 (1962)
- 79) L.GATTERMANN u. T.WIELAND, Die Praxis des org.Chemikers, Berlin 1961, S.330
- 80) H.H.HATT, A.C.TRIFLET u. D.C.WAILES, Austral.J.Chem. 13, 488 (1960)
- 81) E.v.RUDLOFF, Canad.J.Chem. 34, 413 (1956)
- 82) H.L.HERGETT u. E.F.KURTH, Tappi 35, 59 (1952)
- 83) W.D.EMMONS u. G.B.LUCAS, J.Amer.Chem.Soc. 77, 2287 (1955)
- 84) G.D.MAEKINS u. R.SWINDELLS, J.Chem.Soc.(London) 1044 (1959)
- 85) Organic Reactions Bd. 4, 378
- 86) E.JANTZEN u. H.ANDREAS, Chem.Ber. 92, 1427 (1959)
- 87) D.LAVIE, D.WILLNER u. Z.MERENLENDER, Phytochem. Pergamon Press 3, 51 (1964)
- 88) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
- 89) H.S.HENDRICKSON u. C.D.BALLON, J.Biolog.Chem. 239, 1369 (1964)
- 90) T.SWAIN, Chemical Plant Taxonomy, Acad.Press London 1963
- 91) T.KANESHIRO u. A.MARR, Biochem.Biophys.Acta 70, 271 (1963)
- 92) H.P.KAUFMANN u. O.SCHMIDT, Vorratspflege und Lebensmittel-forsch. 1, 166 (1938)
- 93) E.CHARGAFF, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 218, 223 (1933)
- 94) F.H.STODOLA, A.LESUK u. R.J.ANDERSON, J.Biol.Chem. 126, 505 (1938)
- 95) J.CARSON u. R.J.ANDERSON, *ibid.* 126 527 (1938)
- 96) R.J.ANDERSON, J.A.CROWDER, M.S.NEWMAN u. F.H.STODOLA, *ibid.* 113, 637 (1936)
- 97) E.CHARGAFF, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 217, 115 (1933)
- 98) A.P.TULLOCH u. J.F.T.SPENCER, Can.J.Chem. 42, 830 (1964)
- 99) A.P.TULLOCH, J.F.T.SPENCER u. P.A.J.GORIN, *ibid.* 40, 1326 (1962)
- 100) A.C.CHIBNALL, S.H.PIPER u. E.F.WILLIAMS, Biochem.J. 55, 711 (1953)
- 101) T.ODA, J.Pharm.Soc.Japan 72, 138 (1952)
- 102) K.E.BHARUCHA u. F.D.GUNSTONE, J.Chem.Soc.(London) 610 (1957)
- 103) J.W.A.SIMON, A.J.HANAFORD, W.B.WHALLEY, J.Chem.Soc.(London) 4164 (1965)
- 104) I.D.BU'LOCK, E.R.H.JONES u. P.R.LEEMING, J.Chem.Soc.(London) 4270 (1955)
- 105) A.P.TULLOCH, Canad.J.Mikrobiol. 10, 359 (1964)
- 106) A.P.TULLOCH, Canad.J.Chem. 43, 415 (1965)
- 107) P.CHAIT u. J.HAUSSER, Helv.Chim.Acta 12, 463 (1929)
- 108) A.FUJITA u. T.YOSHIKAWA, J.Pharm.Soc.Japan 71, 913 (1951)
- 109) Y.ASAKINA u. M.AKASU, *ibid.* 523, 779 (1925)
- 110) S.ABE, K.SATO, J.Pharm.Soc.Japan, pure Chem.Sect. 75, 952 (1954)
- 111) B.K.AVASTHI u. J.D.TEWARI, J.Am.Pharm.Soc. 44, 625 (1955)
- 112) T.P.HILDITCH u. P.N.WILLIAMS, The Chemical Constitution of Natural Fats, Chapman u. Hall, London 1964

- 113) L.J.MORRIS, R.T.HOLMAN u. K.J.FONTPELL, J.Am.Oil Chemist's Soc. 37, 323 (1960)
- 114) H.E.CARTER, W.D.CELMER, D.S.GALANOS, R.H.GIGG, W.E.M.LANDS, J.H.LAW, K.L.MUELLER, T.NAGAYAMA u. H.H.TOMISANA, J.Am.Oil Chemist's Soc. 35, 335 (1958)
- 115) C.R.SMITH, T.L.WILSON, R.BATES u. C.R.SCHOLFIELD, J.Org. Chem. 27, 3112 (1962)
- 116) C.R.SMITH, T.L.WILSON, T.K.MIWA, H.ZOBEL, R.L.LOHNER u. I.A.WOLFF, J.Am.Oil Chemist's Soc. 39, 133 (1962)
- 117) R.W.MILLER, F.R.EALLE, I.A.WOLFF, *ibid.* 42, 817 (1965)
- 118) K.L.MIKOAJACZAK, C.R.SMITH u. I.A.WOLFF, J.Am.Oil Chemist's Soc. 42, 939 (1965)
- 119) M.KERSCHBAUM, Ber. 60B, 902 (1927)
- 120) I.RIBAS u. E.SEONE, An.Real.Soc.espan.Fisica Quim. 47, 61(1951)
- 121) I.RIBAS u. G.GILUBERA, *ibid.* 49, 145 (1953)
- 122) I.RIBAS u. E.SOEANE, *ibid.* 50, 963 u. 971 (1954)
- 123) G.DUPONT, R.DULOV u. A.CHICOISNE, Bull.Soc.Chim.France 1413 (1956)
- 124) A.CHICOISNE, G.DUPONT u. R.DULOV, *ibid.* 1332 (1957)
- 125) L.SAALMÜLLER, Liebigs Ann. 64, 108 (1848)
- 126) K.SERK-HANSEN, Chem.u.Ind. 1554 (1958)
- 127) A.EIBNER u. E.MÜNZING, Chem.Umschau (Geb.Fette, Öle, Wachse, Harze) 32, 153 (1925)
- 128) H.P.KAUFMANN u. H.BORNHARDT, Fette-Seifen-Anstrichmittel 46, 444 (1939)
- 129) I.S.AGARWAL, J.Sci.Ind.Res.(India) 7B, 136 (1948)
u.S.C.GUPTA, V.SHARMA 10B, 76 (1951)
11B, 463 (1952)
- 130) N.H.E.AHLERS u. F.D.GUNSTONE, Chem.u.Ind. 1291 (1954)
- 131) K.E.BHARUCHA, F.D.GUNSTONE, J.Sci.Food Agr. 7, 606 (1956)
- 132) R.G.POWELL u. C.R.SMITH, Chem.u.Ind. 470 (1965)
- 133) L.I.MORRIS, D.M.WHARRY, J.Chrom.(Amsterdam) 20, 27 (1965)
- 134) S.P.LIGTHELM, Chem.u.Ind. 249 (1954)
- 135) L.COMBIE u. B.P.GRIFFIN, J.Chem.Soc.(London) 4435 (1958)
- 136) H.P.KAUFMANN, J.BALTES u. H.HERMINGHAUS, Fette-Seifen-Anstrichmittel 53, 537 (1951)
- 137) L.GURGEL u. T.F. DE AMORIM, Mem.Inst.Chim.Rio de Janeiro 2, 31 (1929)
- 138) S.PASSERINI u. P.PAPANI, Sep.Sec.Chim.biol. 2, 72 (1951)
- 139) F.D.GUNSTONE, J.Chem.Soc.(London) 1274 (1952)
- 140) F.D.GUNSTONE, J.Sci.Food Agric. 4, 129 (1953)
- 141) F.B.POWER u. H.ROGERSON, Am.J.Pharm. 80, 251 (1908)
- 142) Y.ASAHINA u. T.SHINSIDU, J.Pharm.Soc.Japan 479, 1(1922)
C. 1922, I, 976
- 143) Y.ASAHINA u. S.NAKANISHI, *ibid.* 520, 1(1925) C. 1926, I, 135
- 144) E.J.SHELLARD, Planta medica 9, 102 (1961)
- 145) E.J.SHELLARD, *ibid.* 9, 146 (1961)
- 146) E.J.SHELLARD, *ibid.* 9, 141 (1961)
- 147) Y.ASAHINA u. S.X.TERADA, J.Pharm.Soc.Japan 452, 821 (1919)
- 148) A.SOSA u. M.DELPHINE, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 246, 1731 (1958)
- 149) E.CIONGA, Compt.Rend. 201, 1152 (1935)
- 150) F.R.EARL, K.L.MIKOLAJACZAK, I.A.WOLFF u. A.S.BARCLAY, J.Am.Oil Chemist's Soc. 41, 345 (1964)

- 151) R.C.BADAMI u. L.J.MORRIS, *ibid.* 42, 1119 (1965)
- 152) M.J.CHISHOLM u. C.Y.HOPKINS, *Can.J.Chem.* 38, 2500 (1960)
- 153) C.R.SMITH, M.C.BENNET, T.L.LOHMANN u. I.A.WOLFF, *J.Am.Oil Chemist's Soc.* 37, 320 (1960)
- 154) A.J.MORRIS, R.T.HOLMAN u. K.FONTTELL, *ibid.* 37, 323 (1960)
- 155) R.G.POWELL, C.R.SMITH u. I.A.WOLFF, *ibid.* 42, 165 (1965)
- 156) R.G.POWELL, C.R.SMITH, C.A.GLASS u. I.A.WOLFF, *J.Org.Chem.* 30, 610 (1965)
- 157) M.MATIC, *Biochem.J.* 63, 168 (1956)
- 158) Y.TOYAMA u. H.HIRAI, *Fette-Seifen-Anstrichmittel* 53, 556 (1951)
- 159) D.H.S.HORN, Z.H.KRANZ u. J.A.LAMBERTON, *Austral.J.Chem.* 17, 464 (1964)
- 160) A.BUTENANDT u. H.REMBOLD, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 308, 204 (1957)
- 161) S.A.BARTZER, A.B.FOSTER, D.C.LAMB u. N.HODGSON, *Nature* 183, 996 (1959)
- 162) R.K.CALLOW, N.C.JOHNSON u. I.SIMPSON, *Experientia* 15, 421 (1959)
- 163) S.A.BARKER, A.B.FOSTER, D.C.LAMB u. L.M.JACKMAN, *Nature* 184, 634 (1959)
- 164) J.LEWKOWITSH, *J.Soc.Chem.Ind.* 11, 134 (1892)
- 165) L.DARMSTAEDTER u. J.LIFTSCHÜTZ, *Ber.dtsch.chem.Ges.* 28, 3133 (1895), 29, 618, 1474, 2890 (1896), 31, 97 (1898)
- 166) T.KUWATA, *J.Am.Chem.Soc.* 60, 559 (1938)
- 167) D.H.S.HORN, F.W.HOUGEN, R.von RUDLOFF u. D.A.SUTTON, *J.Chem. Soc.(London)* 177 (1954)
- 168) D.T.DOWNING, Z.H.KRANZ, K.E.MURRAY, *Austral.J.Chem.* 13, 80 (1960)
- 169) Y.KISHIMOTO u. N.S.RADIN, *J.Lip.Res.* 5, 94 (1964)
- 170) Y.KISHIMOTO u. N.S.RADIN, *ibid.* 2, 335 (1961)
- 171) S.O'BRIEN, *ibid.* 5, 109 (1964)
- 172) L.F.ENG, B.GERSTL, R.B.HAYMAN, Y.L.LEE, R.W.TIETZ u. I.K.SMITH, *ibid.* 6, 135 (1965)
- 173) E.KLENK, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 157, 291 (1926)
- 174) A.T.JAMES, I.P.W.WEBB u. T.D.KELLOCK, *Biochem.J.* 78, 333 (1961)
- 175) W.H.TALLENT, J.HARRIS, I.A.WOLFF u. R.E.LUNDI, *Tetrahedron Letters* 36, 4329 (1966)

L e b e n s l a u f

Am 29. März 1938 wurde ich, Klaus Dieter Rehm, als einziges Kind des Apothekers Otto Rehm und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb. Ziller, in München geboren.

1942 wurden wir nach Wurmannsquick/Niederbayern und von dort 1943 nach Grainau bei Garmisch evakuiert. 1945 zogen wir wieder nach München.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschulen in Grainau (1944-1945) und in München(1945-1948) wechselte ich an die Oberrealschule an der Frühlingsstraße in München über, wo ich im Juli 1958 die Reifeprüfung bestand.

In der Stern-Apotheke zu München arbeitete ich zwei Jahre als Apothekerpraktikant. Anschließend studierte ich ab November 1960 an der Universität München ein Semester Naturwissenschaften und sechs Semester Pharmazie und legte dort im Mai 1964 das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Als Kandidat der Pharmazie war ich von Juni bis Dezember 1964 in der Stern-Apotheke in München tätig. Im Juli 1965 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Seit Januar 1965 bin ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München. In der Zeit von März 1965 bis Oktober 1966 befaßte ich mich unter der Leitung von Professor Dr. H. Wagner mit den Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation. Von Januar 1965 bis Dezember 1966 verwaltete ich die Stelle einer wissenschaftlichen Hilfskraft.

